



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/12, C07K 14/705, 16/28, 1/36,</b> <b>G01N 33/53, 33/577, 33/68, A61K 38/17,</b> <b>39/395, C12Q 1/68</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 98/49292</b>  <b>(43) Date de publication internationale: 5 novembre 1998 (05.11.98)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR98/00883  <b>(22) Date de dépôt international:</b> 30 avril 1998 (30.04.98)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 97/05411                      30 avril 1997 (30.04.97)                      FR 98/00927                      28 janvier 1998 (28.01.98)                      FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> VIVIER, Eric [FR/FR]; 20 bis, chemin du Boudard, F-13260 Cassis (FR). MORETTA, Alessandro [IT/IT]; Via Nizza, 18/8, I-16136 Genova (IT). OLCESE, Lucia [IT/IT]; Via Palestro, 23/7A, I-16122 Genova (IT). VELY, Frédéric [FR/FR]; Résidence du Vallat La Farandole, F-13260 Cassis (FR). TOMASELLO, Elena [FR/FR]; 38, allée des Pins, F-13009 Marseille (FR).  <b>(74) Mandataires:</b> PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Armengaud Ainé, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republicée dès            réception de ce rapport.</i>
<b>(54) Title:</b> POLYPEPTIDES ASSOCIATED WITH ACTIVATOR RECEPTORS AND THEIR BIOLOGICAL APPLICATIONS  <b>(54) Titre:</b> POLYPEPTIDES ASSOCIÉS A DES RECEPTEURS ACTIVATEURS ET LEURS APPLICATIONS BIOLOGIQUES  <b>(57) Abstract</b>  <p>The invention concerns novel means for diagnosing, preventing, compensating, treating an abnormal or unwanted functioning of KAR receptors (<i>Killer cell Activatory Receptor</i>), counterparts of non-inhibiting KIR receptors (<i>Killer cell Inhibitory Receptors</i>) of the immunoglobulin or lectin type. The invention concerns, in particular, novel KARAP (<i>KAR-Associated Proteins</i>) polypeptides and their biological applications. A KARAP polypeptide is naturally associated with a KAR receptor, and in the absence of such a KARAP, said KAR receptor is naturally incapable of transducing an activating signal that can be detected. The application also concerns methods for obtaining or identifying such KARAP polypeptides.</p> <b>(57) Abrégé</b>  <p>La présente demande concerne de nouveaux moyens permettant de diagnostiquer, prévenir, pallier, traiter un fonctionnement anormal ou non désiré de récepteurs KAR (<i>Killer cell Activatory Receptor</i>), contreparties non inhibitrices de récepteurs KIR (<i>Killer cell Inhibitory Receptors</i>) de type immunoglobuline ou de type lectine. Elle est notamment relative à de nouveaux polypeptides KARAP (<i>KAR-Associated Proteins</i>) et à leurs applications biologiques. Un polypeptide KARAP, selon l'invention, est naturellement associé à un récepteur KAR, et en l'absence d'un tel KARAP, ledit récepteur KAR est naturellement incapable de transduire un signal activateur détectable. La présente demande vise également des méthodes d'obtention ou d'identification de tels polypeptides KARAP.</p>		

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Benin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Belarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suede		
DK	Danemark	LR	Liberia	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## POLYPEPTIDES ASSOCIES A DES RECEPTEURS ACTIVATEURS ET LEURS APPLICATIONS BIOLOGIQUES

L'invention porte sur de nouveaux polypeptides particuliers capables  
5 de transduire un signal provenant d'un récepteur activateur pour des  
molécules du CMH de classe I, fonctionnant en tant que récepteur autonome  
ou en tant que co-récepteur, et d'un KAR (*Killer-cell Activatory Receptor*) en  
particulier, sur les anticorps obtenus à partir desdits polypeptides servant  
d'immunogènes, et sur les acides nucléiques correspondant auxdits  
10 polypeptides.

L'invention porte également sur les procédés d'obtention de tels  
polypeptides et sur les applications biologiques, plus particulièrement,  
préventives, thérapeutiques et diagnostiques, desdits polypeptides, anticorps  
et acides nucléiques.

15 Pour maintenir la cohérence et assurer l'intégrité de l'organisme, le  
système immunitaire doit mettre en jeu un système coordonné de  
communications intercellulaires.

Différents types de récepteurs interviennent dans ces communications.  
Trois d'entre eux, à savoir les récepteurs pour l'antigène des lymphocytes B  
20 (BCR), les récepteurs pour l'antigène des lymphocytes T (TCR) et les  
récepteurs reconnaissant la portion Fc des anticorps (RFc), sont maintenant  
bien décrits et leurs différentes structures relativement bien connues.

D'autres récepteurs qui ne sont ni récepteurs pour antigènes, ni  
récepteurs pour anticorps ont été décrits mais leurs structures et mécanismes  
25 d'action sont encore mal connus.

Il s'agit de récepteurs pour des molécules du CMH (Complexe Majeur  
d'Histocompatibilité) tels que les KARs (*Killer cell Activatory Receptors*) et  
leur contrepartie inhibitrice, les KIRs (*Killer cell Inhibitory Receptors*).

KARs et KIRs ne sont pas limités aux cellules NK : ils sont également naturellement exprimés par des cellules T.

Les KARs sont hautement homologues aux KIRs (jusqu'à 96% d'homologie entre KARs et KIRs au niveau extracytoplasmique).

5 KARs et KIRs n'assurent cependant pas les mêmes fonctions : les KIRs sont impliqués dans le contrôle négatif (inhibiteur) de l'activation des cellules NK et T, alors que les KARs sont impliqués dans le contrôle positif (stimulateur) de l'activation des cellules NK et T.

Des différences majeures au niveau des domaines trans- et  
10 intracytoplasmiques ont pu être mises en évidence entre isoforme activatrice (KAR) et isoforme inhibitrice (KIR).

En effet, contrairement aux KIRs, les KARs expriment un résidu acide aminé chargé (lysine) dans leur domaine transmembranaire et ne contiennent aucun motif ITIM (motif d'inhibition d'immunorécepteur basé sur résidu(s)  
15 tyrosine) dans leur domaine intracytoplasmique. Les récepteurs monomériques KARs ne contiennent pour autant pas de motif ITAM (motif d'activation d'immunorécepteur basé sur résidu(s) tyrosine).

La situation observée pour les KARs, récepteurs activateurs pour les molécules du CMH, et membres de la IgSF (superfamille des  
20 immunoglobulines), à savoir récepteur activateur, contrepartie d'un récepteur inhibiteur à ITIM, ne présentant lui-même ni ITIM, ni ITAM mais présentant un acide aminé chargé (lysine, arginine, acide aspartique, acide glutamique) transmembranaire, peut être observée pour d'autres types de récepteurs. Il en est ainsi des récepteurs activateurs (ou à tout le moins non inhibiteurs) pour  
25 les molécules du CMH, tels que NKG2C/D (qui est du type lectine et dont la contrepartie inhibitrice est NKG2A/B), mais aussi pour d'autres récepteurs non inhibiteurs, tels que SIRP  $\beta$  et ILT 1, dont les ligands sont encore inconnus et qui ont été décrits soit des cellules hématopoïétiques et sur des



cellules non-hématopoïétiques (SIRP  $\beta$ ), soit sur des cellules B, macrophages et cellules dendritiques (ILT1).

Les KARs peuvent fonctionner en tant que récepteurs autonomes, notamment pour des molécules du CMH de classe I. On sait ainsi que  
5 l'engagement des KARs avec des molécules du CMH de classe I exprimées sur la surface de cellules cibles, initie les programmes d'activation lymphocytaires tel qu'il a été établi du fait de la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracytoplasmique et de l'induction de la lyse des cellules cibles.

Outre leurs fonctions de récepteurs autonomes pour des molécules du  
10 CMH, les KARs peuvent également assurer des fonctions co-réceptrices pour des récepteurs TCR et RFc (Mandelboim O. *et al.*, 1996, *Science* 274:2097 ; Cambiaggi A. *et al.*, 1996, *Blood* 87:2369).

En effet, lors de la reconnaissance de fragments constants (Fc) d'immunoglobulines G (IgG) par des récepteurs tels que CD16 (RFc $\gamma$ III), et  
15 lors de la reconnaissance d'antigènes par le complexe CD3/TCR restreint par des molécules du CMH de classe I ou II, les KARs peuvent jouer le rôle de co-récepteurs et ainsi augmenter l'intensité de la réponse cellulaire, en particulier face à de petites quantités d'antigènes, maintenir la réponse cellulaire dans le temps, et également coopérer à la stimulation de la  
20 prolifération cellulaire.

Le rôle des KARs, naturellement exprimés sur des sous-populations lymphocytaires NK et T, n'est pas restreint par leurs ligands propres, à savoir les molécules du CMH de classe I, mais s'étend à l'équilibre du système immunitaire de manière générale.

25 Le fonctionnement des KARs naturellement exprimés influe ainsi sur la prolifération de cellules NK et T, la production par de telles cellules de substances de type cytokines, la lyse de cellules cibles telles que cellules autologues délétères, malignes ou infectées par des virus, cellules

allogéniques, mais aussi sur la tolérance du système immunitaire face à certains antigènes.

Tout non- ou dys-fonctionnement des KARs peut donc conduire à différentes pathologies ou réactions indésirées, toutes liées au fonctionnement du système immunitaire, telles que maladies d'immuno-déficience, maladies  
5 auto-immunes (*e.g.* sclérose en plaque), tumeurs, infections virales, bactériennes, parasitaires, allergies, rejets de greffe. Il a, par exemple, été montré que si l'homme ne présente en moyenne que moins de 10% de lymphocytes exprimant des KARs, la quasi-totalité des lymphocytes de  
10 patients atteints de LDGL (maladie lymphoproliférative des lymphocytes granulaires) exprime des KARs.

La présente invention a pour but de fournir des moyens permettant de diagnostiquer un fonctionnement anormal ou non désiré de récepteurs activateurs pour des molécules du CMH de classe I tels que les KARs et d'en  
15 contrôler le fonctionnement.

L'invention a ainsi pour objet de nouveaux polypeptides, ci-après désignés KARAP (*KAR-Associated Proteins*), qui sont nécessaires à la transduction d'un signal provenant d'un KAR, ainsi que les anticorps et acides nucléiques obtenus à partir desdits nouveaux polypeptides. Elle a également  
20 pour objet un procédé d'obtention desdits nouveaux polypeptides ainsi que leurs applications biologiques.

Par "récepteur KAR", nous entendons, dans la présente, les récepteurs humains de type immunoglobuline contreparties non inhibitrices des récepteurs KIR, tels que les récepteurs KAR p50 (KIRIIDS1 à KIRIIDS5),  
25 KIRIIDS1, mais également tout récepteur non inhibiteur de structure similaire à ces récepteurs KAR, et notamment les récepteurs humains de type lectine tels que NKG2C, NKG2D (naturellement exprimés sur des cellules NK et T), les récepteurs murins de type immunoglobuline tels que pir A (naturellement exprimés sur des cellules myéloïdes, des cellules B), gp49A

(naturellement exprimés sur des mastocytes), les récepteurs murins de type lectine tels que Ly49D, Ly49H (naturellement exprimés sur des cellules NK et T).

Nous entendons donc par polypeptide KARAP tout polypeptide isolé (autre qu'un KAR) en l'absence duquel ledit récepteur KAR est naturellement incapable de transduire un signal activateur détectable. Ceci n'exclut pas le fait qu'un polypeptide KARAP déterminé puisse non seulement s'associer à un récepteur KAR tel que ci-dessus défini, mais également à d'autres récepteurs monomériques activateurs ou non inhibiteurs de structure proche de celle des KAR tels que ci-dessus défini, et notamment à un récepteur activateur humain de type immunoglobuline de la famille LIR/MIR/ILT tel que ILT1.

Le terme "polypeptide" comprend, dans la présente demande, non seulement ledit polypeptide, mais également les homologues de ce polypeptide, tels qu'obtenus par délétion, insertion, inversion ou substitution conservatrice d'acides aminés, et les fragments de ce polypeptide, tels qu'obtenus par hydrolyse dudit polypeptide à l'aide de protéases, lesdits homologues ou fragments étant capables de transduire un signal provenant d'un KAR. Ce terme "polypeptide" couvre, dans la présente demande, aussi bien des polypeptides que des protéines.

Un polypeptide selon l'invention est nécessaire à la transduction du signal reçu par un récepteur KAR : il s'agit donc d'un polypeptide isolé qui permet la restauration d'une activation KAR déficiente. Pour déterminer si un polypeptide isolé donné permet la restauration d'une activation KAR déficiente, l'homme du métier peut procéder en montrant qu'il existe un récepteur KAR qui, si il est exprimé par une cellule appropriée en l'absence de ce polypeptide, ne parvient pas à transduire un signal activateur détectable, ou ne parvient pas à transduire un signal activateur satisfaisant pour l'application visée. Un mode de réalisation de cette détermination est

présenté dans l'exemple 3 ci-après par comparaison entre la capacité d'activation (relargage de sérotonine) d'une cellule RBL-2H3 exprimant le récepteur KAR p50.2 seul, et celle d'une cellule RBL-2H3 qui exprime à la fois le récepteur KAR p50.2 et son polypeptide KARAP. Des exemples de  
5 cellules appropriées sont présentées en figure 5 ci-après.

Par "activation KAR déficiente restaurée", nous entendons que la transduction, à la cellule, par ledit KAR d'un signal activateur significatif est possible, ou, le cas échéant, satisfaisante. Ceci peut être testé notamment à l'aide d'une stimulation cellulaire par des anticorps.

10 Pour déterminer au niveau d'une cellule si un signal provenant d'un KAR est ou non transduit, et pour déterminer si un tel signal est stimulé ou inhibé, de nombreux moyens sont à la disposition de l'homme du métier. Des exemples de tels moyens incluent la stimulation dudit KAR par un ligand et la mesure des cytokines sécrétées (*cf.* par exemple, Cambiaggi *et al.* 1996, Blood 87:2369), de la prolifération cellulaire (*cf.* par exemple Mandelboim *et al.* 1996, Science 274:2097), de la cytotoxicité (*cf.* par exemple le test de cytotoxicité redirigée ci-après décrit), de la mobilisation du calcium intracytoplasmique (*cf.* par exemple Bléry *et al.*, 1997, J. Biol. Chem. 272, 8989-8996), et/ou de l'induction de phosphorylation (*cf.* par exemple Vivier  
15 *et al.* 1991, J. Immunol. 146:206).

Un polypeptide selon l'invention est en outre caractérisé en ce qu'il est capable de s'associer à un KAR, et de ne pas s'associer à la contrepartie inhibitrice de ce KAR.

Des méthodes permettant de déterminer si un polypeptide est capable  
25 de s'associer à un KAR, et de ne pas s'associer à la contrepartie inhibitrice de ce KAR (c'est-à-dire de ne pas s'associer au récepteur KIR correspondant), sont bien connues de l'homme du métier. Un exemple d'une telle méthode comprend notamment :

- faire exprimer ce polypeptide à une cellule  $KAR^+ KIR^-$  d'une part, et à une cellule  $KAR^- KIR^+$ ,

- à immunoprécipiter une ou plusieurs fraction(s) polypeptidique(s) à partir du lysat de ces cellules à l'aide d'au moins anticorps anti-KAR et/ou anti-KIR,

- à observer la présence dudit polypeptide dans la ou les fraction(s) issues de la cellule  $KAR^+ KIR^-$ , et l'absence de ce même polypeptide dans la ou les fractions issues de la cellule  $KAR^- KIR^+$ . Des exemples d'anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR comprennent les anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement les anticorps monoclonaux EB6, GL183 ou PAX250. Une méthode permettant de faire exprimer un tel polypeptide par une cellule est indiquée dans l'exemple 3 ci-dessous.

Un polypeptide KARAP selon l'invention peut par ailleurs être caractérisé en ce qu'il est tel qu'obtenu :

i. par immunoprécipitation d'une ou plusieurs fraction(s) polypeptidique(s) de lysats de cellules exprimant des récepteurs KAR capables de transduire un signal activateur à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR, tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,

ii. chaque fraction polypeptidique pouvant optionnellement être plus avant épuisée par élimination des fractions immunoprécipitées à l'aide d'anticorps anti-CD3 $\zeta$  et/ou anti-Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ , et/ou être à nouveau précipitée à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,

iii. par résolution des polypeptides de ladite (desdites) fraction(s) polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire, et récupération des

polypeptides correspondant à un poids moléculaire de  $12 \pm 2$  kDa environ, ou bien

par résolution des polypeptides de ladite (desdites) fraction polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire après avoir soumis ladite (lesdites) fraction(s) polypeptidique(s) à un test kinase, et récupération des polypeptides phosphorylés correspondant à un poids moléculaire de 12, 14 et/ou  $16 \pm 2$  kDa environ. Le test kinase peut être réalisée tel que ci-après décrit dans les exemples (cf. matériel et méthodes de l'exemple 1 ci-après).

Lesdites cellules exprimant des récepteurs KAR capables de transduire un signal activateur peuvent notamment être des cellules NK et/ou des cellules T et/ou des cellules myéloïdes et/ou des cellules B et/ou mastocytes. Des moyens pour déterminer si un KAR est capable ou non de transduire un signal à la cellule ont été ci-avant indiqués.

Un polypeptide KARAP selon la présente invention est en outre caractérisé en ce que sa séquence en acides aminés :

- présente au moins un acide aminé tyrosine phosphorylable,
- présente une masse moléculaire comprise entre  $10 \pm 2$  et  $16 \pm 2$  kDa environ (notamment, masse moléculaire réelle de  $10 \pm 2$  kDa, masse moléculaire apparente sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes de  $12 \pm 2$  à  $16 \pm 2$  kDa selon le degré de phosphorylation).

Il est en outre caractérisé en ce que sa séquence en acides aminés comporte au moins un motif ITAM  $YxxL/Ix_{6-8}YxxL/I$  en région intracytoplasmique.

Selon un aspect de l'invention, la séquence en acides aminés d'un polypeptide KARAP comporte une région extracytoplasmique, une région transmembranaire, et/ou une région entracytoplasmique. De manière caractéristique, cette région intracytoplasmique est majoritaire relativement aux autres régions de la séquence de ce polypeptide. Des moyens pour identifier les régions extracytoplasmiques, transmembranaires,

intracytoplasmiques sont connus de l'homme du métier (par exemple, algorithmes d'hydropathicité, formation de vésicules inversées).

Selon un autre aspect de l'invention, la séquence en acides aminés d'un polypeptide KARAP comporte au moins un acide aminé cystéine  
5 extracytoplasmique.

Selon encore un autre aspect de l'invention, la séquence en acides aminés d'un polypeptide KARAP, comporte au moins un acide aminé chargé (R, K, D, E) transmembranaire.

Les polypeptides selon l'invention peuvent être phosphorylés au niveau  
10 d'au moins un résidu tyrosine, ou être non phosphorylés.

Dans une forme de réalisation selon l'invention, lesdits polypeptides se présentent sous la forme de dimères liés par un pont disulfure ; ils s'associent de manière sélective et non covalente à des KARs qui fonctionnent, soit en tant que récepteurs autonomes pour des molécules du  
15 CMH de classe I, soit en tant que co-récepteurs du TCR ou d'un RFc tel que CD16.

Selon un aspect avantageux de l'invention, un polypeptide KARAP est capable de se lier à une molécule à domaine SH2 telle que ZAP-70, p72<sup>syk</sup>, p56<sup>lck</sup>, p59<sup>fyn</sup>, p60<sup>lyn</sup>, Grb-2, pp36-38 (lat), PLC- $\alpha$ 1, p85 (PI-3 kinase), Shc,  
20 ou à une molécule à domaine PTB (*PhosphoTyrosine Binding*) telle que Shc. Une telle liaison peut être observée par incubation de polypeptides selon l'invention avec des molécules à domaine SH2 ou PTB et mesure de la résonance de plasmons (Olcese *et al.* 1996, The Journal of Immunology 156:4531-4534).

25 Un polypeptide KARAP particulier selon l'invention présente une séquence en acides aminés essentiellement constituée par la SEQ ID n°2. La présente invention vise également les polypeptides dont la séquence est essentiellement constituée par la partie extracytoplasmique de la SEQ ID n°2, à savoir la SEQ ID n°3, ou par la partie transmembranaire de la SEQ ID n°2,

à savoir la SEQ ID n°4, ou la partie intracytoplasmique de la SEQ ID n°2, à savoir la SEQ ID n°5. D'autres polypeptides KARAP particuliers selon l'invention présentent une séquence en acides aminés essentiellement constituée par la SEQ ID n°11, n°12, n°13, n°14, n°15, n°17 (séquence  
5 consensus de la protéine KARAP de souris C57Bl/6), ou n°28 (séquence protéique de la KARAP de souris 129 obtenue à partir de la séquence génomique).

De tels polypeptides peuvent également être obtenus, après séquençage, par synthèse chimique ou à l'aide des techniques d'ADN  
10 recombinant.

Lesdits polypeptides KARAPs sont nécessaires à la transduction de signaux provenant de récepteurs activateurs, les KARs, qui ne présentent ni ITIM ni ITAM intracytoplasmiques mais qui présentent un résidu acide aminé transmembranaire.

15 Selon une disposition avantageuse, les polypeptides selon l'invention sont modifiés par glycosylation, phosphorylation, sulfonation, biotinylation, acylation, estérification, ou par addition, substitution, suppression d'entités de forme moléculaire proche de celle des groupes phosphate, telles que le phosphonate, par addition de réactifs de marquage tels que la luciférase, la  
20 GFP (*Green Fluorescence Protein*) ou ses analogues, par addition de cibles de purification telles qu'un ligand d'affinité, par addition d'entités modifiant sa solubilité. Des modifications d'intérêt particulier comprennent celles qui modifient ledit polypeptide de telle sorte à bloquer ou inhiber sa capacité à transduire le signal reçu (stratégie du transdominant négatif). Un polypeptide  
25 selon l'invention, sous une forme ainsi modifiée, trouve notamment des applications dans toute composition ou méthode destinée à moduler de manière négative (inhiber) une réponse immunitaire donnée, notamment une réponse immunitaire non désirée ou anormale (par exemple, maladies auto-immunes, allergies, rejet de greffe). Des modifications ainsi appropriées



comprennent celles qui rendent la phosphorylation sur tyrosine dudit polypeptide non hydrolysable dans des conditions biologiques (par exemple, par addition de groupes phosphonates). Elles comprennent également celles qui rendent non fonctionnel un résidu aminoacide critique au fonctionnement d'un polypeptide selon l'invention : par exemple, par substitution ou mutation  
5 d'un résidu tyrosine (Y), notamment un résidu tyrosine contenu dans un motif ITAM, en un résidu phénylalanine (F), ce qui empêche la liaison dudit polypeptide ainsi modifié à une protéine à domaine SH2 ou PTB.

Selon une autre disposition avantageuse, les polypeptides de  
10 l'invention, leurs fragments, homologues, ou formes modifiées sont capables de traverser une membrane cellulaire, c'est-à-dire une bicouche lipidique.

La présente invention vise également les anticorps, notamment les anticorps monoclonaux, et les fragments de tels anticorps, en particulier les fragments Fc, Fv, Fab, F(ab)'<sub>2</sub>, CDR, tels qu'obtenus par immunogenèse à  
15 partir d'un polypeptide KARAP selon l'invention, ou tels qu'obtenus à partir d'un fragment, homologue ou forme modifiée d'un tel polypeptide.

Elle a en particulier pour objet des fragments de tels anticorps, en particulier fragment Fc, Fv, Fab, F(ab)'<sub>2</sub>, CDR, tels qu'obtenus par immunogenèse à partir d'un polypeptide dont la séquence est essentiellement  
20 constituée par la partie extracytoplasmique, intracytoplasmique, ou transmembranaire d'un tel polypeptide KARAP selon l'invention. Elle vise notamment de tels anticorps capables de reconnaître, selon une réaction du type antigène-anticorps, la SEQ ID n°2, la SEQ ID n°3, la SEQ ID n°4, la SEQ ID n°5, SEQ ID n°11, SEQ ID n°12, SEQ ID n°13, SEQ ID n°14, SEQ  
25 ID n°15, SEQ ID n°17 et/ou SEQ ID n°28, ainsi que leurs fragments.

De tels anticorps sont obtenus par immunisation d'animaux, tels que lapins et souris, contre des polypeptides, fragments, homologues ou formes modifiées selon l'invention tels qu'essentiellement obtenus par élution de bandes électrophorétiques, par synthèse chimique ou par une technique de

protéines de fusion solubles (GST), lesdits polypeptides, fragments, homologues ou formes modifiées étant optionnellement couplés à des immunogènes tels que l'ovalbumine.

Des anticorps monoclonaux sont alors produits par fusion hybridomale  
5 des cellules spléniques immunes, criblage et purification des surnageants de culture (Köhler et Milstein, 1975, Nature 256, 495-497 ; Antibodies, a laboratory manual, 1988, Harlow and David Lane, Ed. Cold Spring Harbor laboratory).

A partir de ces anticorps, des dianticorps peuvent être générés selon  
10 des procédures standards. Lesdits fragments peuvent, si nécessaire, être insérés ou greffés à des structures humanisantes.

La présente invention vise également les acides nucléiques comprenant une séquence correspondant à la lecture en cadre ouvert, selon le code génétique universel et en tenant compte de la dégénérescence dudit code, de  
15 la séquence en acides aminés d'un polypeptide, fragment, ou homologue selon l'invention, ainsi que les variants qui présentent une homologie supérieure ou égale à 60% avec de tels acides nucléiques, et qui sont capables de coder pour une molécule transductrice d'un signal activateur provenant d'un KAR tel que ci-avant défini. Elle vise notamment tout acide  
20 nucléique dont la séquence ADN est essentiellement constituée par la SEQ ID n°1 (ADNc de la protéine KARAP mature de séquence SEQ ID n°2), n°6, n°7, n°8, n°9, n°10, n°16 (séquence ADNc consensus du KARAP de souris C57Bl/6), n°27 (séquence ADNc du KARAP de souris 129 obtenue à partir de la séquence génomique), n°18 (séquence génomique du KARAP de souris  
25 129), ou n°31 (séquence ADNc du KARAP humain), ou par toute partie correspondant aux régions extra-, intra-cytoplasmique et/ou transmembranaires de ces séquences, ou par toute partie correspondant à un exon ou un intron de ces séquences.

La présente invention vise également un procédé d'obtention d'un polypeptide selon l'invention comprenant les étapes :

- i. d'immunoprécipiter une ou plusieurs fraction(s) polypeptidique(s) de lysats de cellules exprimant des récepteurs KAR fonctionnels (cellules NK et/ou des cellules T et/ou des cellules myéloïdes et/ou des cellules B et/ou mastocytes par exemple) à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR, tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,
- 10 ii. chaque fraction polypeptidique pouvant optionnellement être plus avant épuisée par élimination des fractions immunoprécipitées à l'aide d'anticorps anti-CD3 et/ou anti-Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ , et/ou être à nouveau précipitée à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement  
15 l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,
- iii. de séparer les polypeptides de ladite (desdites) fraction(s) polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire et récupérer les polypeptides correspondant à un poids moléculaire de  $12 \pm 2$  kDa environ, ou bien  
de séparer les polypeptides de ladite (desdites) fraction(s)  
20 polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire après avoir soumis ladite (lesdites) fraction(s) polypeptidique(s) à un test kinase, et récupérer les polypeptides phosphorylés correspondant à un poids moléculaire de 12, 14 et/ou  $16 \pm 2$  kDa environ.

La présente demande a également pour objet une méthode pour obtenir  
25 la séquence de polypeptides KARAP particuliers selon l'invention. Cette méthode, dont un exemple de réalisation est décrite dans l'exemple 2 ci-après (stratégies bio-informatiques), comprend notamment le criblage de celles des séquences polypeptidiques qui répondent aux critères suivants :

- la séquence présente au moins un acide aminé tyrosine phosphorylable.
- la séquence présente une masse moléculaire comprise entre 5 et 25 kDa environ.
- 5       - la séquence comporte une région extracytoplasmique, une région transmembranaire, et une région intracytoplasmique,
- la séquence comporte au moins un acide aminé cystéine dans sa région extracytoplasmique,
- la séquence comporte au moins un acide aminé chargé (R, K, D, E)
- 10       dans sa région transmembranaire, et
- la séquence comporte au moins un motif ITAM YxxL/Ix<sub>6-8</sub>YxxL/I dans sa région intracytoplasmique,
- le polypeptide correspondant à la séquence sélectionnée devant être capable de s'associer à un KAR, et de ne pas s'associer au récepteur
- 15       contrepartie inhibitrice correspondant (KIR), comme ci-avant défini.

La présente demande a également pour objet une méthode pour déterminer ou contrôler si un polypeptide candidat correspond à un polypeptide KARAP selon l'invention. Un exemple de réalisation d'une telle méthode est présenté dans l'exemple 2 ci-après. Une telle méthode consiste à

20       produire un anticorps contre une partie caractéristique de ce polypeptide candidat (par exemple une région intracytoplasmique comprenant au moins un motif ITAM ou une région extracytoplasmique), et à vérifier qu'il existe un récepteur KAR qui, lorsqu'il est exprimé de manière fonctionnelle sur une cellule, se trouve associé à un élément reconnu, selon une réaction de type

25       antigène-anticorps, par ledit anticorps.

Cette méthode, selon l'invention, d'identification de polypeptides KARAP consiste ainsi notamment à :

- produire un anticorps mono- ou polyclonal dirigé contre ce polypeptide candidat, et en particulier contre une région extracytoplasmique

de ce polypeptide candidat et/ou une région qui comprend au moins un motif ITAM (par exemple, dans le cas de la protéine KARAP de souris SEQ ID n°2 identifiée ci-dessus, un anticorps dirigé contre une région de la partie extracytoplasmique (SEQ ID n°3) ou de la partie intracytoplasmique (SEQ ID n°5) de la SEQ ID n°2),

- mettre en contact cet anticorps avec un lysat de cellules, possédant, sous une forme fonctionnelle, le récepteur activateur ou non inhibiteur pour lequel le polypeptide candidat est supposé constituer le KARAP, dans des conditions douces permettant des réactions de liaison de type antigène-anticorps,

- identifier le polypeptide candidat comme étant un polypeptide KARAP selon l'invention lorsque dans les produits de réaction éventuellement formés, se trouvent un produit de masse moléculaire apparente proche de celle dudit récepteur activateur ou non inhibiteur (environ 50 kDa pour le KAR p50) et un produit de masse moléculaire apparente proche de celle du polypeptide candidat (notamment entre 10 et 16 kDa environ).

Cette méthode d'identification selon l'invention peut notamment être réalisée :

- en mettant en contact ledit anticorps comme ci-dessus décrit,
- faire précipiter les produits de réaction éventuellement formés dans des conditions douces de détergent préservant les complexes moléculaires (par exemple digitonine à 1%, voir exemple 1 ci-dessus),
- mesurer la masse moléculaire des produits précipités, par exemple par migration électrophorétique en présence des marqueurs de masse moléculaire sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, et
- en identifiant le polypeptide candidat comme étant un polypeptide KARAP selon l'invention comme ci-dessus décrit.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable, une quantité efficace d'au moins un polypeptide, KARAP, fragment, homologue ou forme modifiée selon l'invention, d'au moins un anticorps ou fragment d'anticorps selon l'invention, ou d'au moins un acide nucléique ou variant d'acide nucléique selon l'invention.

La composition pharmaceutique selon l'invention peut être formulée sous forme solide, liquide ou sous forme d'une suspension, pour une administration orale, parentérale, topique, intravaginale, intrarectale ou pour une inhalation orale et/ou nasale.

Ladite composition pharmaceutique selon l'invention est destinée à moduler l'activité d'un KAR. Pour stimuler l'activité d'un KAR, ladite composition pharmaceutique comprendra des agents facilitant la transduction du signal provenant dudit KAR, tels que, par exemple, polypeptides, fragments, homologues, ou acides nucléiques, variants selon l'invention capables de traverser une bicouche lipidique. Pour inhiber l'activité d'un KAR, ladite composition pharmaceutique comprendra des agents bloquant la transduction des signaux issus dudit KAR tels que, par exemple, des fragments d'anticorps selon l'invention capables de traverser une bicouche lipidique de manière à bloquer les KARAPs cellulaires, ou des polypeptides modifiés, selon l'invention, phosphorylés ou non, par exemple à phosphorylation non hydrolysables dans des conditions biologiques, de manière à bloquer des protéines à domaine SH2 (ZAP-70, p72<sup>syk</sup>) ou PTB ou toute molécule adaptatrice ou effectrice de l'activation dudit KAR. De telles modifications comprennent notamment l'addition de groupements phosphonates, et/ou la mutation d'au moins un résidu Tyrosine (Y) en résidu phénylalanine (F).

La présente demande vise donc une composition pour la prévention, la palliation, et/ou le traitement d'un fonctionnement anormal ou non désiré d'une cellule impliquée dans une réaction immunitaire. Une telle composition comprend avantageusement des polypeptides, ou, le cas échéant, des polypeptides modifiés selon l'invention.

Pour déterminer au niveau d'une cellule si un signal provenant d'un KAR est ou non transduit, et pour déterminer si un tel signal est stimulé ou inhibé, de nombreux moyens sont à la disposition de l'homme du métier. Des exemples de tels moyens ont été ci-avant indiqués.

L'utilisation desdits polypeptides, anticorps et acides nucléiques, en tant qu'agents de diagnostic, entre également dans le champ de la présente invention (méthodes de diagnostic, et kits de diagnostics permettant de les mettre en oeuvre).

La présente invention vise également une méthode de diagnostic *in vitro* d'un fonctionnement anormal ou non désiré d'une cellule comprenant les étapes de :

- mise en contact d'au moins une cellule, ou un extrait de cellule, avec un anticorps selon l'invention, ou un fragment d'un tel anticorps, ou avec un acide nucléique selon l'invention ou un variant d'un tel acide nucléique, et de
- révélation du produit de réaction éventuellement formé.

L'étape de mise en contact est réalisée dans des conditions notamment de durée, température, tampon, le cas échéant de réticulation de gel, permettant l'établissement d'une réaction de type antigène-anticorps par exemple par ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbant Assays*), où le cas échéant, d'une réaction de type hybridation d'acides nucléiques et PCR (amplification en chaîne par polymérase).

Pour la révélation du produit de réaction éventuellement formé, peuvent être utilisés des marqueurs tels que marqueurs fluorescents, enzymatiques, radioactifs ou luminescents.

Ladite méthode de diagnostic *in vitro* selon l'invention permet le diagnostic de fonctionnements cellulaires anormaux ou non désirés pouvant se traduire par une maladie immunoproliférative, une maladie d'immunodéficience telle qu'une maladie à VIH, un cancer tel que la maladie lymphoproliférative des lymphocytes granulaires, une maladie auto-immune  
5 telle que la polyarthrite rhumatoïde, une maladie infectieuse telle que le paludisme, une réponse allergique, un rejet de greffe.

La présente invention se rapporte également à une méthode d'identification de molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un  
10 KAR, et à une méthode d'identification de molécules capables de moduler une activité cellulaire résultant de l'activation d'un KAR.

Ladite méthode d'identification de molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR selon l'invention comprend les étapes de :

15 i. mise en contact des molécules candidates avec des polypeptides selon l'invention (ou avec des fragments ou homologues de tels polypeptides), et de

ii. sélection de celles des molécules candidates pour lesquelles une liaison auxdits polypeptides (ou auxdits fragments de polypeptides) est  
20 observée.

Les molécules candidates susceptibles d'être des molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR peuvent être par exemple choisies parmi les molécules à domaine SH2 ou PTB. Elles peuvent se présenter sous forme recombinante soluble.

25 L'étape de mise en contact peut être, par exemple, réalisée par couplage des molécules candidates, obtenues sous forme recombinante soluble, susceptibles d'être des molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR, à des billes permettant la mesure de la radioactivité telles que billes de liquide scintillant, et par passage, sur lesdites billes, de



polypeptides selon l'invention (ou de fragments ou homologues de tels polypeptides) sous forme tritiée. Sont alors sélectionnées celles des molécules candidates pour lesquelles une liaison auxdits polypeptides, fragments, ou homologues est observée par mesure de la radioactivité (cpm).

5 L'étape de mise en contact peut également être réalisée par immobilisation de polypeptides selon l'invention (ou de fragments ou homologues de tels polypeptides) sur des microsupports permettant la mesure de la résonance de plasmons tel que des microsupports BIAcore (Pharmacia) (*cf.* par exemple Olcese *et al.*, 1996, The Journal of Immunology 156:4531-  
10 4534 ; Vély *et al.*, Immunology Letters 1996, vol.54. p145-150), ou par immobilisation de polypeptides selon l'invention phosphorylés et biotinylés sur des billes streptavidine (Vély *et al.* Eur. J. Immunol. 1997, 27: 1994-2000; Le Dréan *et al.* Eur. J. Immunol. 1998, 28: 264-276), et par passage, sur lesdits microsupports, de molécules candidates susceptibles d'être des  
15 molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR. Sont alors sélectionnées celles des molécules candidates pour lesquelles une liaison auxdits polypeptides, fragments, ou homologues est observée par mesure de la résonance de plasmons (Resonance Unit).

Cette méthode d'identification des molécules adaptatrices ou  
20 effectrices de l'activation d'un KAR, quel qu'en soit son mode de réalisation, peut également servir de référentiel dans la mise en oeuvre de la méthode d'identification de molécules capables de moduler une activité cellulaire résultant de l'activation d'un KAR selon l'invention.

Cette méthode d'identification de molécules capables de moduler une  
25 activité cellulaire résultant de l'activation d'un KAR, selon l'invention, comprend les étapes de :

i. mise en contact des molécules candidates avec des molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR telles qu'obtenues par la

méthode selon l'invention ci-avant décrite et avec des polypeptides selon l'invention (ou avec des fragments ou homologues de tels polypeptides), et de

- ii. sélection de celles des molécules candidates qui exercent un effet sur la liaison entre lesdits polypeptides (ou lesdits fragments ou homologues de polypeptides) et lesdites molécules adaptatrices ou effectrices, telle qu'observée en l'absence desdites molécules candidates.

Les molécules candidates susceptibles de moduler une activité cellulaire résultant d'un KAR peuvent être choisies parmi des banques de composés naturels ou synthétiques, en particulier parmi des banques chimiques ou combinatoires. Lesdites molécules candidates peuvent être de nature protéique (par exemple, dérivés ou fragments d'anticorps anti-idiotypes tels que les anticorps selon l'invention, dérivés ou fragments d'anticorps catalytiques), de nature carbonée, lipidique ou nucléique.

L'étape de mise en contact de la méthode d'identification de molécules capables de moduler une activité cellulaire résultant de l'activation d'un KAR, selon l'invention, peut être, par exemple, réalisée par incubation desdites molécules candidates avec des polypeptides selon l'invention (ou avec des fragments ou homologues de tels polypeptides) et avec des molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR, telles qu'obtenues par la méthode selon l'invention, dans des conditions permettant une mesure du taux de liaison entre lesdits polypeptides et lesdites molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR, par exemple, en se basant sur une propriété chimique desdites molécules adaptatrices ou effectrices à l'état non lié, telle que propriété enzymatique, propriété de phosphorylation ou d'auto-phosphorylation.

L'étape de mise en contact de la méthode d'identification de molécules capables de moduler une activité cellulaire résultant de l'activation d'un KAR, selon l'invention, peut également être réalisée par mise en oeuvre de techniques du type billes de liquide scintillant et polypeptides tritiés ou du

type microsupport et mesure de la résonance de plasmons, telles que ci-avant décrites, en mesurant la radioactivité ou, respectivement, la résonance de plasmons, résultant de la liaison entre lesdits polypeptides et lesdites molécules adaptatrices ou effectrices, en l'absence et en présence des

5 molécules candidates. Sont alors sélectionnées celles des molécules candidates qui soit augmentent soit diminuent de manière statistiquement significative le taux de liaison témoin mesuré entre lesdits polypeptides et lesdites molécules adaptatrices ou effectrices en l'absence desdites molécules candidates.

10 Les molécules capables de moduler l'activation d'un KAR, telles qu'identifiées par la méthode selon l'invention, peuvent être modifiées chimiquement de manière à les rendre non hydrolysables dans des conditions biologiques, et/ou de manière à ce qu'elles puissent traverser une bicouche lipidique cellulaire.

15 Les molécules capables de moduler l'activation d'un KAR, selon l'invention, avantageusement agissent en modifiant l'interaction entre lesdits KARAPs et leurs effecteurs ou adaptateurs cellulaires.

Lesdites molécules capables de moduler une activité cellulaire résultant de l'activation d'un KAR, selon la présente invention, peuvent alors être

20 appliquées à une cellule cultivée *in vitro*, telle que cellule lymphocytaire, dont l'activité KAR a été stimulée, par exemple, par mise en contact avec un ligand. Cette application se fait par pénétration à l'intérieur de ladite cellule, par exemple, par électroporation ou par modification chimique permettant le franchissement d'une bicouche lipidique.

25 La présente invention est illustrée par les exemples suivants qui ne doivent être en aucun cas considérés comme limitatifs.

Il y est fait référence aux 23 figures suivantes:

- la Figure 1 présente

en A, une analyse par cytomètre de flux (FACScan, marque déposée Becton-Dickinson) en immunofluorescence indirecte de cellules cultivées sur IL-2 (interleukine 2) et issues de patients atteints de LDGL (maladie lymphoprolifératrice des lymphocytes granulaires) désignés par R.P., D.F. et  
5 MAL., et

en B, les résultats d'un test de cytotoxicité re-dirigé avec différents anticorps monoclonaux, réalisé sur des cellules NK cultivées sur IL-2 provenant de différents donneurs ;

- la Figure 2 présente :

10 en A, une analyse SDS-PAGE (résolution de protéines par électrophorèse sur gel et dodécylsulfate de sodium) réalisée à partir de cellules NK de donneur R.P. (p50.1<sup>+</sup>) radiomarquées au <sup>125</sup>I et immunoprécipitées à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-CD158 EB6, avant et après épuisement en FcεRIγ et en CD3ζ à l'aide d'anticorps anti-CD3ζ /  
15 anti-FcεRIγ,

en B, une analyse SDS-PAGE avec une sonde anticorps anti-CD3ζ de lysats complets de cellules D.F. ou d'immunoprécipités de tels lysats ;

- la Figure 3 présente :

en A, une analyse SDS-PAGE des protéines phosphorylées issues de  
20 tests kinase *in vitro* auxquels ont été soumis des immunoprécipités de lysats de cellules NK MAL.,

en B, le même type d'analyse SDS-PAGE qu'en figure 3A mais réalisée à partir de cellules RBL-2H3 p50.2<sup>+</sup>,

en C, une analyse par électrophorèse sur couche mince (TLE) des  
25 acides aminés phosphorylés des bandes KARAPs et CD3ζ excisées après tests kinase *in vitro* réalisés sur des immunoprécipités anti-CD158 et anti-CD16, respectivement, de cellules NK R.P.,

- la Figure 4 présente une analyse SDS-PAGE bidimensionnelle en conditions non-dénaturantes/dénaturantes d'immunoprécipités anti-CD158 de lysats de cellules NK R.P. ayant subi un test kinase, et

- la Figure 5 présente les récepteurs activateurs ou non-inhibiteurs de la superfamille des immunoglobulines (IgSF) ou du type lectine, et leurs  
5 contreparties inhibitrices,

- la Figure 6 représente la structure schématique de récepteurs KIR (p58) et KAR (p50),

- la Figure 7 représente la séquence ADNc d'un polypeptide KARAP  
10 de souris selon l'invention (SEQ ID n°1),

- la Figure 8 représente la séquence nucléotidique (comprise entre la séquence leader exclue et le codon stop) et la séquence en acides aminés d'un polypeptide KARAP selon l'invention (protéine mûre, SEQ ID n°2), et

- la Figure 9 représente l'alignement des ITAMs et de l'ITAM d'un  
15 polypeptide KARAP selon l'invention,

- les Figures 10A, 11A, 12A, 13A et 14A illustrent respectivement les séquences ADNc des EST AA242315, AA734769, W88159, AA098506 et W41142 (SEQ ID n°6 à SEQ ID n°10),

- les Figures 10B, 11B, 12B, 13B et 14B illustrent respectivement les  
20 séquences protéiques des EST AA242315, AA734769, W88159, AA098506 et W41142 (SEQ ID n°11 à SEQ ID n°15),

- la Figure 15 représente l'alignement des séquences ADNc des EST AA242315, AA734769, W88159, AA098506 et W41142, et la séquence consensus résultante (SEQ ID n°16 ; ADNc KARAP de souris C57Bl/6  
25 consensus),

- la Figure 16 représente l'alignement des séquences protéiques des EST AA242315, AA734769, W88159, AA098506 et W41142, et la séquence consensus résultante (SEQ ID n°17 ; protéine KARAP de souris C57Bl/6 consensus).

- la Figure 17 représente la séquence du gène KARAP de souris de lignée 129 (SEQ ID n°18 ; 2838 pb),

- la Figure 18 représente l'organisation génomique du KARAP de souris de lignée 129,

5       - la Figure 19 représente la séquence ADNc du KARAP de souris de lignée 129 (SEQ ID n°27) et la séquence protéique correspondante (SEQ ID n°28),

10       - la Figure 20 représente de haut en bas, l'organisation génomique du gène KARAP de souris de lignée 129, la séquence protéique correspondante, et la nature des différentes régions de cette protéine,

- la Figure 21 représente l'ADNc du KARAP humain (SEQ ID n°31),

15       - la Figure 22 représente le pourcentage de sérotonine relargée dans le surnageant par les cellules RBL-2H3 doublement transfectées p50/KARAP humain, et stimulées par l'anticorps indiqué en abscisse (à gauche : aucun anticorps ; au centre IgE de souris : mIgE 1/500 ; à droite : GL183 5µg/ml),

- la Figure 23 illustre l'homologie entre l'organisation du gène KARAP humain et celle du gène KARAP murin.

## **EXEMPLE 1 :**

20

### **1. Matériels et méthodes**

#### **Anticorps monoclonaux (mAbs) et réactifs**

25   Les anticorps monoclonaux suivants ont été utilisés :

- des anticorps anti-CD3, anti-CD16 et anti-CD56 d'isotype IgG1 tels que JT3A (Coulter Immunotech référence 0178), KD1 (Coulter Immunotech référence 0813) et TA181.H12 (Coulter Immunotech référence 1844), respectivement,

- des anticorps anti- CD3 $\zeta$  tels que TIA-2 (Coulter Immunotech 66045P2),

- des anticorps anti-CD158, à savoir des anticorps anti-p58.1 tels que EB6 (Coulter Immunotech référence 1847), des anticorps anti-p58.2 tels que  
5 GL183 (Coulter Immunotech référence 1846) et des anticorps anti-p50.3 tels que PAX250 décrit dans Bottino *et al.* (*Eur. J. Immunol.* 1996, 26, 1816),

- un antisérum de lapin anti-Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  tel que l'antisérum 666 décrit dans Jouvin M.H. *et al.*, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 5918-5925,

- un antisérum de lapin anti-Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  tel que l'antisérum BC4 décrit dans  
10 Bociano L.K. *et al.*, 1986, *J. Biol. Biochem.* 261, 11823-11831,

- un antisérum de chèvre anti-souris conjugué à la peroxydase de raifort (Sigma A-2304) et un antisérum de chèvre anti-lapin conjugué à la peroxydase de raifort (Sigma A-0545),

- une immunoglobuline de chèvre anti-souris conjuguée à de  
15 l'isothiocyanate de fluoresceine (Coulter-Immunotech 0819 F(ab')<sub>2</sub>),

- des anticorps monoclonaux GL183-Phycoérythrine (GL183-PE) (Coulter-Immunotech 2278), (EB6-Phycoérythrine (EB6-PE) (Coulter-Immunotech 2277) et une immunoglobuline de chèvre anti-souris-phycoérythrine (anti-souris-PE) (Coulter Immunotech 0855 F(ab')<sub>2</sub>).

20 Le tampon de lyse contenait du Tris-HCl 25 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM ; digitonine 1% ; orthovanadate de sodium 100  $\mu$ M ; NaF 10 mM ; aprotinine 2  $\mu$ g/ml ; leupeptine 2  $\mu$ g/ml ; tous ces produits ayant été achetés auprès de Sigma (St Louis, MO, USA).

Le tampon kinase contenait de l'Hepes 20mM pH 7,2 ;  
25 NaCl 100 mM ; MnCl<sub>2</sub> 5 mM ; MgCl<sub>2</sub> 5mM ; <sup>32</sup> $\gamma$  ATP 10  $\mu$ Ci = 370 kBq (Amersham, Buckinghamshire, UK).

Le tampon d'électrophorèse sur couche mince (TLE) contenait de l'acide acétique glacial à 10% et de la pyridine à 1% dans de l'eau ; pH 3.5.

## Cellules

### Cellules NK humaines issues de patients LDGL ou cellules LDGL :

5

Les cellules NK humaines ont été obtenues à partir de patients atteints de maladie lymphoproliférative des lymphocytes granulaires (LDGL, *Lymphoproliferative Disease of Granular Lymphocytes*) de la lignée des cellules NK CD56<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>. Des lymphocytes de sang périphérique (PBL, *Peripheral Blood Lymphocyte*) ont été isolés à partir d'échantillons de sang de patients atteints de LDGL par centrifugation selon un gradient Ficoll/Hypaque. Ces cellules LDGL ont été alors cultivées à 37°C à une concentration de 10<sup>6</sup> cellules par ml sur milieu RPMI-1640, à 10 µg/ml de pénicilline-streptomycine et 10 % de sérum de veau foetal, en présence de  
10  
15 cellules nourricières irradiées allogéniques et de 100 U/ml de rIL-2.

### Obtention de cellules transfectées RTIIB.p50.2<sup>+</sup> :

Des transfectants de cellules RBL-2H3 (American Type Culture  
20 Collection) exprimant des KARs p50.2 (cellules RTIIB.p50.2<sup>+</sup>) ont été réalisées telles que décrites dans Bléry *et al.* 1997, J. Biol. Chem., 272, 8989-8996). La figure 6, représente de manière schématique, la structure de récepteurs KIR p58 (récepteurs humains inhibiteurs de type immunoglobuline) et des récepteurs KAR p50 (contrepartie non inhibitrice  
25 des récepteurs KIR p58).

Brièvement, les cellules RTIIB utilisées sont les cellules classiquement décrites comme étant des cellules RBL-2H3 transfectées de manière à exprimer le récepteur FcγRIIb2 murin et la molécule chimérique CD25/CD3



comprenant les domaines ecto- et trans-membranaires complets de la CD25 humaine liés au domaine intracytoplasmique complet de la CD3 murine.

Ces cellules RTIIB ont été de plus transfectées par électroporation d'ADNc 183.Act2 (codant pour p50.283) porté sur le vecteur d'expression  
5 RSV-5gpt.

Des cellules transfectées RTIIB.p50.2<sup>+</sup> stables ont été établies par culture en présence de xanthine (250 µg/l), d'hypoxanthine (13,6 µg/l) et d'acide mycophénolique (2 µg/l).

#### 10 Test Cytolytique

L'activité cytolytique des cellules LDGL cultivées sur IL-2 a été mesurée par rapport à la lignée cellulaire murine P815 (American Type Culture Collection) en l'absence ou en présence des mAbs anti-CD16, anti-  
15 CD158 et anti-CD56.

Brièvement,  $5 \times 10^3$  cellules cibles marquées au <sup>51</sup>Cr ont été ajoutées à des dilutions en série de cellules effectrices en présence de 50 µl d'anticorps monoclonal surnageant d'hybridome au démarrage du test standard de libération de <sup>51</sup>Cr durant 4 heures (Vivier E. *et al.*, 1991, *J. Immunol.*  
20 146:206).

#### Radio-ioduration

Les cellules ( $10 - 50 \times 10^6$ ) ont été fixées au formaldéhyde à 0,5%  
25 dans du PBS (tampon de phosphate de sodium), puis perméabilisées pendant 5 minutes à l'aide de digitonine à 30 µg/ml dans du PBS préalablement à une ioduration catalysée par la lactoperoxidase (<sup>125</sup>I, NEN-Dupont, Wilmington, DE, USA) tel que décrit par Anderson P. *et al.*, 1989, *J. Immunol.* 143:1899.

Les cellules ont été lysées pendant 30 minutes à 4°C dans un tampon de lyse à digitonine. Les surnageants post-nucléaires pré-purifiés ont alors été immunoprécipités à l'aide d'anticorps spécifiques couvrant des billes S4B-Sépharose (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) (Vivier E. *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 146:206). Les immunoprécipités ont été analysés par SDS-PAGE (résolution de protéines par électrophorèse sur gel et dodécylsulfate de sodium) et autoradiographie.

### Test kinase *in vitro*

10

Les cellules ( $10 \times 10^6$  par échantillon) ont été lysées dans 1 ml de tampon de lyse (voir réactifs). Les surnageants post-nucléaires prépurifiés ont été immunoprécipités pendant 2 à 3 heures en utilisant des anticorps monoclonaux liés de manière covalente à une Sépharose 4B activée par CnBr (Pharmacia). Les complexes immuns ont été lavés trois fois dans du tampon de lyse ; 40 µl de tampon kinase (voir réactifs) ont alors été ajoutés aux immunoprécipités pendant 10 minutes à 37°C. La réaction kinase a été arrêtée par addition du tampon réducteur SDS-échantillon. Les échantillons ont été portés à ébullition préalablement à une analyse par SDS-PAGE et autoradiographie. Dans certaines expériences, les échantillons ont été analysés par SDS-PAGE diagonale non-dénaturante/dénaturante bidimensionnelle.

20

### Analyse de la phosphorylation des KARAPs

25

Après le test kinase *in vitro* et la séparation par SDS-PAGE, les protéines phosphorylées ont été excisées des gels séchés et ont été éluées en utilisant un Centrifugeur (Amicon) ou une solution de SDS (dodécylsulfate de sodium) à 0,1% dans du PBS (tampon de phosphate de sodium). Les

protéines éluées ont été précipitées dans de l'acide trichloroacétique à 20% à 4°C pendant 2 heures, préalablement à une incubation dans 200 µl d'HCl 5,7 M à 110°C pendant 90 minutes. Les acides aminés individuels ont alors été séchés et remis en suspension dans 5 µl de tampon TLE (voir réactifs) contenant 5 µg de chaque phosphotyrosine, phosphothréonine, phosphosérine non marquée (Sigma) en tant qu'étalons standards. Les échantillons ont été déposés sur des plaques de cellulose (DC-cellulose 100-µm) et mis à migrer à 1500 V pendant 45 minutes à 4°C sur un Multiphor II (Pharmacia). Des étalons standards ont été développés à l'aide de ninhydrine à 1% dans de l'acétone et les acides aminés marqués au  $^{32}\text{P}$  ont été identifiés par autoradiographie.

### **Analyse par immunotransfert**

Les immunoprécipités ont été résolus par SDS-PAGE, transférés sur filtres de nitrocellulose et confrontés aux sondes anticorps anti-CD3ζ ou anti-FCεRIγ diluées dans une solution de PBS à 5% en lait déshydraté écrémé. Les immunotransferts ont été révélés en utilisant un antisérum de chèvre anti-souris ou anti-lapin conjugué à la peroxydase de raifort (Sigma références A-2304 et A-0545 respectivement) et le système de détection ECL commercialisé par Amersham (RPN 2209).

## **2. Résultats**

### **Phénotype de surface**

Le phénotype de surface des cellules NK issues de patients LDGL et cultivées sur IL-2 (interleukine-2) a été analysé par FACScan (tri de cellules activées par fluorescence) en immunofluorescence indirecte.

Sont ci-après reportés les résultats de l'étude relative à trois de ces patients, ci-après nommés R.P., D.F. et MAL.

Lesdits résultats sont illustrés par la Figure 1A où est présentée une analyse par FACScan en immunofluorescence indirecte de cellules LDGL (maladie lymphoproliférative des lymphocytes granulaires) R.P., D.F. ou MAL. cultivées sur IL-2. Une immunoglobuline de chèvre anti-souris  
5 conjuguée à de l'isothiocyanate de fluoresceine a servi de réactif de seconde étape. Pour chaque type de cellules LDGL (cellules LDGL R.P. pour les analyses présentées dans la bande horizontale supérieure, cellules LDGL D.F. pour celles de la bande horizontale médiane, cellules LDGL MAL. pour celles de la bande horizontale inférieure) et pour chaque traitement subi  
10 (traitement témoin C pour les graphes présentés à gauche ou traitement par l'anticorps monoclonal indiqué, soit de gauche à droite, anti-CD3, anti-CD16, anti-CD158 EB6, anti-CD158 GL183, anti-CD158 PAX 250), sont reportées, en abscisse, les intensités de fluorescence et, en ordonnées, le nombre relatif de cellules.

15

On peut observer que :

- les cellules NK R.P., D.F. et MAL. sont toutes CD3<sup>+</sup> et CD16<sup>+</sup>,
- les cellules NK R.P. sont p50.1<sup>+</sup>, p50.2<sup>-</sup>, p50.3<sup>-</sup> : elles sont reconnues par l'anticorps monoclonal anti-CD158 EB6 et ne sont pas reconnues par les  
20 anticorps monoclonaux anti-CD158 GL183 et PAX250,
- les cellules NK D.F. sont p50.1<sup>-</sup>, p50.2<sup>+</sup>, p50.3<sup>-</sup> : elles sont reconnues par l'anticorps monoclonal anti-CD158 GL183 et ne sont pas reconnues par les anticorps monoclonaux anti-CD158 EB6 et PAX250,
- les cellules NK MAL. sont p50.1<sup>-</sup>, p50.2<sup>-</sup>, p50.3<sup>+</sup> : elles sont  
25 reconnues par l'anticorps monoclonal anti-CD158 PAX250 et ne sont pas reconnues par les anticorps monoclonaux anti-CD158 EB6 et GL183.

Les trois patients atteints de LDGL ont donc présenté une lymphoprolifération de cellules NK reconnue par des anticorps anti-CD158 : anti-KIR p58.1 (EB6), anti-KIR p58.2 (GL183) et anti-KAR p50.3

(PAX250) respectivement. Trois groupes de cellules NK ont ainsi pu être définis : cellules LDGL R.P., cellules LDGL D.F. et cellules LDGL MAL.

### Test cytolytique

5

Des essais de cytotoxicité re-dirigée utilisant P815 en tant que cellules cibles  $Fc\gamma R^+$  ont été réalisés pour les cellules NK R.P.  $p50.1^+$ , D.F.  $p50.2^+$  et MAL.  $p50.3^+$ .

Les résultats sont illustrés par la Figure 1B où est présenté un test de  
10 cytotoxicité re-dirigée avec différents anticorps monoclonaux : des cellules NK issues des donneurs indiqués (R.P.  $p50.1^+$  à gauche, D.F.  $p50.2^+$  au centre, ou MAL.  $p50.3^+$  à droite) et cultivées sur IL-2 ont été utilisées comme cellules effectrices. Le test a été réalisé en présence de : aucun anticorps (cercles blancs), anticorps monoclonal anti-CD16 (triangles noirs),  
15 anticorps monoclonal anti-CD56 (triangles blancs), anticorps monoclonal anti-CD158 (EB6 pour R.P., GL183 pour D.F. et PAX250 pour MAL.) (cercles noirs). En abscisse sont reportés les ratios cellules effectrices : cellules cibles (ratio E:T ; 8:1 ; 4:1 ; 2:1 ; 1:1 ; 0,5:1 ; 0,25:1) et, en ordonnées, le pourcentage de lyse spécifique. (échelle de 0 à 120%).

20 Les tests de cytotoxicité re-dirigée indiquent que, par contraste avec ce qui est observé lors d'une stimulation de récepteurs KIRs, l'addition d'anticorps anti-CD158 aux cellules NK augmente considérablement la cytolyse des cellules P815 (Figure 1B).

A titre de témoins, les anticorps monoclonaux anti-CD16 augmentent  
25 la cytolyse spontanée des P815 de manière similaire aux anticorps monoclonaux anti-CD158, alors qu'un anticorps monoclonal anti-CD56 apparié à l'isotype n'a aucun effet (Figure 1B).

Ces cellules NK expriment donc à leur surface des KARs, l'isoforme activatrice des KIRs. Ces résultats ont été, de plus, confirmés par analyses

PCR (amplification en chaîne par polymérase) avec transcriptase inverse des ADNc KIR/KAR.

**Analyse des KARs exprimés par radio-ioduration et immunotransferts :**

5 **identification des KARAPs**

Les récepteurs KARs exprimés sur les cellules NK issues de patients LDGL ont été analysés par radio-ioduration interne suivie d'immunoprécipitation.

10 Les résultats sont illustrés par la figure 2A où est présentée une analyse SDS-PAGE, sur gel à 13% en conditions dénaturantes, réalisée à partir de cellules NK ( $10 \times 10^6$  cellules/piste) de donneur R.P. (p50.1<sup>+</sup>) radiomarquées au <sup>125</sup>I et immunoprécipitées à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-CD158 EB6 (piste 1), puis purifiées à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-  
15 CD3 $\zeta$ /anti-FC $\epsilon$ RI $\gamma$  (pistes 2 à 7) et enfin re-immunoprécipitées à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-CD158 EB6 (piste 8).

Les mêmes profils ont été obtenus avec les donneurs D.F. (p50.2<sup>+</sup>) et MAL. (p50.3<sup>+</sup>) (données non présentées).

On peut observer que les immunoprécipités d'anticorps anti-CD158  
20 préparés à partir de lysats de cellules NK contiennent, en plus des KARs observés à  $\approx 50$  kDa, une bande de masse moléculaire plus faible migrant à  $12 \pm 1$  kDa environ.

Il a été montré que les KIRs s'associent avec les polypeptides CD3 $\zeta$  et FC $\epsilon$ RI $\gamma$  dans les cellules NK humaines. Les expériences de pré-épuisements  
25 utilisant des anticorps anti-CD3 $\zeta$  et anti-FC $\epsilon$ RI $\gamma$  ont éliminé la possibilité que la bande de 12 kDa environ associée au KARs soit CD3 $\zeta$  ou FC $\epsilon$ RI $\gamma$  (Figure 2A).

L'ensemble protéique correspondant à cette bande à  $12 \pm 1$  kDa environ a été baptisé KARAPs (*KAR-associated proteins*, protéines associées aux KARs).

Ces résultats ont été confirmés par des expériences d'immunotransferts  
5 qui ont révélé l'absence de toute bande réactive en présence d'anticorps anti-CD3 $\zeta$  dans les immunoprécipités de mAbs anti-CD158 préparés à partir de lysats NK.

Ces résultats, obtenus en présence d'anticorps anti-CD3 $\zeta$ , sont illustrés par la figure 2B où est présentée une analyse de lysats complets de cellules  
10 D.F. ou d'immunoprécipités de tels lysats par résolution SDS-PAGE sur gel à 15% en conditions dénaturantes et incubation des filtres de nitrocellulose avec une sonde anticorps monoclonal anti-CD3 $\zeta$  (flèche de marquage à droite). Les lysats complets de cellules (LCC) D.F. ont été déposés à  $5 \times 10^6$  cellules/piste en piste 1, les immunoprécipités de tels lysats à  $15 \times 10^6$   
15 cellules/piste en pistes 2 à 4. Les immunoprécipitations ont été réalisées sur des lysats de cellules D.F. en utilisant l'anticorps monoclonal anti-Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  BC4 en témoin piste 2, l'anticorps monoclonal anti-CD16 en piste 3 et l'anticorps monoclonal anti-CD158 GL183 en piste 4.

Les mêmes résultats ont été obtenus pour les cellules R.P. et MAL., à  
20 l'aide de mAb anti-CD3 $\zeta$ .

Les résultats obtenus à l'aide de mAb anti-FC $\epsilon$ RI $\gamma$  (données non présentées) ont apporté la même confirmation.

#### Analyse des KARAPs par test kinase *in vitro* et électrophorèse sur 25 couche mince (TLE)

Les tests kinase *in vitro* réalisés sur les immunoprécipités d'anticorps monoclonaux anti-CD158 ont révélé que les KARs s'associent à une

phosphoprotéine prédominante de faible poids moléculaire migrant à environ  $14 \pm 1$  kDa dans les cellules NK.

Les résultats sont illustrés par la figure 3A : des lysats préparés à partir de cellules NK MAL ont été immunoprécipités avec l'anticorps indiqué  
5 (anti-FcεRIα en piste 1, anti-CD16 en piste 2, anti-CD158 en piste 3) préalablement à des tests kinase *in vitro*. Les protéines phosphorylées ont été séparées par SDS-PAGE sur un gel à 15% en conditions dénaturantes.

Ces résultats sont en accord avec le changement de masse moléculaire attendue pour la forme phosphorylée de la KARAP à 12 kDa observée par  
10 ioduration interne. De plus, les immunoprécipités de mAbs anti-CD158 préparés à partir de cellules NK KAR<sup>+</sup> comprennent deux autres phospho-KARAPs, migrant à  $16 \pm 1$  kDa et  $12 \pm 1$  kDa respectivement (signalés par un astérisque de part et d'autre de la flèche KARAP à 14 kDa en Figure 3A).

15 L'association des KARs avec un groupe similaire de KARAPs phosphorylées a aussi été observée avec un panel de clones de cellules NK KAR<sup>+</sup> et était absente de clones NK KIR<sup>+</sup>. Il a été observé que l'intensité relative des phospho-KARAPs à 16,14 et 12 kDa peut varier selon l'origine des cellules NK.

20 Une analyse des acides aminés phosphorylés a révélé que la KARAP majeure à 14 kDa est principalement phosphorylée au niveau des résidus tyrosine.

Les résultats sont illustrés par la figure 3C : les bandes KARAPs (à gauche) et CD3ζ (à droite) ont été excisées après test kinase *in vitro* et  
25 soumises à une analyse des acides aminés phosphorylés par électrophorèse sur couche mince. Dans cette expérience, les bandes KARAPs et CD3ζ ont été isolées à partir d'immunoprécipités d'anticorps monoclonaux, respectivement, anti-CD158 et anti-CD16 préparés à partir de lysats de cellules NK. R.P.



Néanmoins, une phosphorylation au niveau de résidus sérine mais non au niveau de résidus thréonine peut aussi être détectée. A titre de témoin, l'analyse des acides aminés phosphorylés a confirmé la phosphorylation de CD3 $\zeta$  au niveau du résidu tyrosine seulement.

5

### **KARAPs et transduction du signal activateur (transfectants KAR<sup>+</sup>)**

Par contraste avec les KIRs p58.2, l'expression de KAR p50.2 dans les transfectants de la lignée cellulaire non lymphoïde RBL-2H3 ne conduit pas à une reconstitution de la fonction activatrice des KARs p50.2. En effet, la stimulation de transfectants de cellules RBL-2H3 p50.2<sup>+</sup> induite par des anticorps anti-CD158 ne conduit à aucune mobilisation détectable du Ca<sup>2+</sup> intracytoplasmique, ni à aucune libération détectable de sérotonine.

De manière remarquable, les tests kinase *in vitro* réalisés sur les immunoprécipités d'anticorps monoclonaux anti-CD158 préparés à partir de transfectants de cellules RBL-2H3 p50.2<sup>+</sup> n'ont inclus aucune KARAP détectable.

Les résultats sont illustrés par la figure 3B : des lysats préparés à partir de cellules RBL-2H3 p50.2<sup>+</sup> ont été immunoprécipitées avec l'anticorps indiqué (anti-CD3 $\epsilon$  en piste 1, anti-Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  en piste 2, anti-CD158 en piste 3) préalablement à des tests kinase *in vitro*. Les protéines phosphorylées ont été séparées par SDS-PAGE sur un gel à 15% en conditions dénaturantes.

Le défaut d'association des KARs aux KARAPs dans les transfectants de cellules RBL-2H3 p50.2<sup>+</sup> a été également confirmé par ioduration interne (données non présentées).

Les KARAPs s'associent donc de manière sélective aux KARs, et l'absence d'association des KARs aux KARAPs est corrélée avec l'incapacité des KARs à transduire un quelconque signal activateur détectable.

### **Association KAR-KARAPs (gel diagonal)**

Finalement, une analyse sur gel bidimensionnel diagonal des immunoprécipités d'anticorps monoclonaux anti-CD158 a révélé que les phospho-KARAPs de 16, 14 et 12 kDa environ décroissent le long du gel diagonal.

5 Les résultats sont illustrés par la figure 4 : des immunoprécipités (IP) d'anticorps monoclonaux anti-CD158 préparés à partir de lysats de cellules NK R.P. ont été soumis à un test kinase *in vitro* préalablement à analyse par SDS-PAGE sur gel à 13% bidimensionnel en conditions non-dénaturantes/(direction horizontale)/dénaturantes (direction verticale).

10 Ces résultats indiquent ainsi que les KARs sont associés dans les cellules NK à un complexe de dimères KARAPs liés par liaison disulfure.

### **3. Discussion**

Les KARs, récepteurs activateurs autonomes, notamment pour des  
15 molécules du CMH de classe I, ou co-récepteurs du TCR (récepteur de lymphocyte T) ou de RFc (récepteur pour fragment constant d'immunoglobuline), représentent une voie nouvelle pour l'activation des cellules NK et T.

Les inventeurs ont démontré que les KARs sont en fait assemblés dans  
20 les cellules NK en un complexe multimérique faisant intervenir des KARAPs associées sous forme de dimères liés par liaison disulfure.

Si l'analyse par radio-ioduration a mis en évidence une KARAP à environ  $12 \pm 1$  kDa, l'analyse par test kinase a mis en évidence trois phospho-KARAPs à environ 16, 14 et  $12 \pm 1$  kDa.

25 La corrélation entre l'association des KARs aux KARAPs et la fonction activatrice des KARs suggère que les KARAPs agissent en tant que sous-unités transductrices du complexe KAR multimérique.

Cependant, l'absence d'association des KARs aux KARAPs, telle qu'observée pour les transfectants de cellules RBL-2H3, n'empêche pas

l'expression du récepteur sur la surface cellulaire, contrairement à ce qui a été observé pour les récepteurs activateurs multimériques pour antigènes ou anticorps incluant des polypeptides à ITAM (motif d'activation d'immunorécepteurs basée sur résidu(s) tyrosine(s)).

5 D'autres récepteurs activateurs, ou à tout le moins non inhibiteurs, de la superfamille des immunoglobulines présentent de frappantes similarités avec les KARs p50 (KARs humains de type immunoglobuline) : les récepteurs KARs humains de type lectine NKG2C/D, les récepteurs KAR murins de type immunoglobuline  $\mu$ ir A, gp49A, les récepteurs KAR murins de type  
10 lectine Ly49D, Ly49H, mais aussi les récepteurs activateurs humains de la famille LIR/MIR/ILT tels que ILT 1.

Ces similarités sont illustrées par la figure 5 où sont présentés les récepteurs activateurs ou non-inhibiteurs de la superfamille des immunoglobulines (IgSF) ou du type lectine, et leurs contreparties  
15 inhibitrices. En dessous du nom de chaque couple de récepteurs (de gauche à droite, mPIR-B-mPIR-A, ILT2-ILT1, SIRP $\alpha$ -SIRP $\beta$ , KIR-KAR, Fc $\gamma$ RIIB-Fc $\gamma$ RIII, NKG2A/B-NKG2C/D, mLy49A/B/C/E/F/G/I-mLy49D/H), sont indiquées les cellules les exprimant naturellement. Les récepteurs activateurs ou non-inhibiteurs ne présentent ni ITIM (motif d'inhibition  
20 d'immunorécepteur basée sur résidu(s) tyrosine) ni ITAM (motif d'activation d'immunorécepteur basée sur résidu(s) tyrosine) mais présentent un résidu acide aminé chargé dans leur domaine transmembranaire (TM) (R = arginine, K= lysine, D=acide aspartique, E=acide glutamique). Les contreparties inhibitrices (élément gauche de chaque couple) comportent un motif ITIM  
25 dans leur partie intracytoplasmique (IC). Chaque récepteur activateur, ou non-inhibiteur, présente, au niveau extracytoplasmique (EC), une forte homologie avec sa contrepartie inhibitrice.

## EXEMPLE 2 :

La caractérisation biochimique des molécules KARAPs (cf. exemple 1 ci-dessus) nous a permis de préciser les critères d'identification principaux des polypeptides KARAP, et notamment :

- 5           - polypeptides comportant un acide aminé cystéine extracytoplasmique, permettant la formation de ponts disulfures (cf. Figure 4)
- polypeptide de masse moléculaire apparente comprise entre 12 et 16 kDa environ,
- polypeptides présentant au moins un acide-aminé tyrosine
- 10       phosphorylable (cf. Figure 3C).

Etant données les fortes similarités existant entre les molécules KARAPs identifiées à 12, 14 et 16 kDa, nous avons supposé que ces trois formes moléculaires représentaient des degrés de phosphorylation différents du même polypeptide KARAP, dont le poids moléculaire ne pouvait dépasser

15   12 kDa.

De plus, une caractéristique majeure des KARAPs réside dans leur association sélective avec les KARs, et non pas avec les KIRs. Etant donné que, contrairement aux KIRs, les KAR possèdent un acide aminé chargé transmembranaire (lysine : K), et que cette particularité est aussi à la base de

20   l'association des polypeptides à ITAM présents dans les complexes CD3/TCR, BCR, FcεRI et FcγRIIIA (CD16), nous avons orienté notre stratégie d'identification du gène KARAP en considérant que KARAP est un nouveau membre de la famille des polypeptides transmembranaire à ITAM. Ces derniers partagent en effet avec KARAP les mêmes caractéristiques :

- 25       - polypeptides comportant un acide aminé cystéine extracytoplasmique (C), permettant la formation de ponts disulfures,
- polypeptide de faible masse moléculaire ne dépassant pas 25 kDa,
- polypeptides présentant au moins un acide aminé tyrosine phosphorylable comprise dans un motif ITAM: YxxL/Ix<sub>6-8</sub>YxxL/I, et

- présence d'un acide aminé chargé transmembranaire

Nous avons ainsi élaboré une stratégie bio-informatique d'identification d'un gène à partir des banques de cDNA publiques disponibles sous la forme EST, GENBANK, SWISSPROT et EMBL. Nous avons utilisé 2 approches  
5 différentes:

1/ Nous avons traduit selon les 6 phases de lecture l'ensemble des EST, en ne retenant que les peptides ayant entre 50 et 200 acides aminés (poids moléculaire envisagé compris entre 5,5 et 22 kDa). Sur cette sous-base, nous avons appliqué plusieurs critères de sélection :

- 10 - existence d'une région transmembranaire prédite d'au moins 10 acides aminés, commençant avant l'acide aminé 30, selon la méthode d'Argos (Rao & Argos, 1986, Biochem. Biophys. Acta, 869, 197-214). En effet, par homologie avec les polypeptides à ITAM tels que CD3 $\zeta$  et Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ , la majeure partie de la séquence KARAP est prédite comme étant  
15 intracytoplasmique.

- recherche d'un motif ITAM (Y-x-x-[IL]-x(6,8)-Y-x-x[IL]) en position C-terminale de la zone transmembranaire.

- présence dans la région transmembranaire d'un acide aminé chargé (R, K, D, E).

- 20 - présence d'un acide aminé cysteine (C) en position C-terminale de la zone transmembranaire.

2/ Recherche des entrées EST (analyse faite également avec EMBL, GENBANK et SWISSPROT) présentant des similarités de séquences avec l'entrée CD3Z\_HUMAN. Le programme utilisé est TBLASTN (version  
25 1.4.11; Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, and David J. Lipman, 1990, J. Mol. Biol. 215, 403-10) ou TBLASTN (version 2.0.3; Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman, 1997, Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402). Sur ces entrées similaires, nous

avons ensuite appliqué les critères de sélection utilisés dans la première approche.

En combinant ces deux approches bio-informatiques et après avoir successivement déterminé à l'aide de profils d'hydrophobicité (programmes  
5 Genworks, DNA Strider) les régions leader, transmembranaires, intra- et extracytoplasmique des molécules candidates, nous avons obtenu un nombre important de séquences correspondant potentiellement à celle de KARAP. Parmi ces séquences, la séquence correspondant au numéro d'accension AA242315 sur Genbank nous est apparu comme la séquence du gène  
10 KARAP de la souris (SEQ ID n°1 ADNc souris C57Bl/6). La figure n°7 représente la séquence ADN (SEQ ID n°1 ADNc) d'un polypeptide KARAP selon l'invention ; cette séquence correspond à la séquence du gène KARAP de souris. En effet, la traduction de la séquence nucléotidique donne un cadre de lecture ouvert de 396 nucléotides (SEQ ID n°2). Ce résultat est  
15 illustré par la figure n°8 où est représentée la partie de séquence nucléotidique du gène KARAP (SEQ ID n°1) qui est comprise entre la séquence leader (exclue) et le codon stop, et où est également représentée, en-dessous de cette séquence nucléotidique, la séquence en acides aminés (code à 1 lettre) correspondante (SEQ ID n°2, code à 3 lettres), c'est-à-dire  
20 la séquence en acides aminés de la protéine KARAP de souris mature selon l'invention (SEQ ID n°2). L'analyse standard de cette séquence prévoit une protéine mature de 87 acides aminés (masse moléculaire de 9,6 kDa), une partie extracytoplasmique de 16 acides aminés (Q1-G16), une partie transmembranaire de 24 acides aminés (V17-G40), et une partie  
25 intracytoplasmique de 47 acides aminés (R41-R87). Conformément à notre stratégie de recherche, la partie extracytoplasmique comprend au moins un acide aminé cystéine (en fait deux, C8 et C10), un acide aminé transmembranaire (D25), et un ITAM intracytoplasmique (Y65QELQGQRHEVY76SDL). La figure 9 illustre les comparaisons qui

peuvent être faites par alignement de séquences entre les polypeptides à ITAMs préalablement décrits et les polypeptides selon l'invention possédant un (ou des) motifs ITAM, et indique la séquence ITAM consensus résultante : la figure 9 représente l'alignement des ITAMs de polypeptides à ITAM (six

5 CD3, un Ig $\alpha$ , un Ig $\beta$ , Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  et Fc $\epsilon$ RI $\beta$ ) et d'un motif ITAM du polypeptide KARAP murin (SEQ ID n°2) identifié ci-dessus selon l'invention (indiqué "KARAP" sur cette figure 9). Sur cette base de comparaison avec les ITAMs préalablement décrits (Figure 9), il nous a été permis d'envisager l'association des KARAP phosphorylées avec des protéine tyrosine kinases à groupement

10 SH2 en tandem (telles que ZAP-70 et p72Syk). L'association des KARAPs avec des protéines de fusion recombinantes correspondant aux groupements SH2 de ZAP-70 (préparation décrite dans: Olcese L., Lang P., Vély F., Cambiaggi A., Marguet D., Bléry M., Hippen K. L., Biassoni R., Moretta A., Moretta L., Cambier J. C., Vivier E. 1996, J. Immunol. 156:4531-4534), a

15 été vérifié *in vitro*: ces expériences ont été réalisées comme décrit dans la Figure 3A, piste 3, mais les lysats cellulaires ont été adsorbés par la protéine de fusion recombinante correspondant aux groupements SH2 de ZAP-70, au lieu de l'anticorps anti-CD158. Ainsi KARAP est une nouvelle molécule transmembranaire à ITAM qui s'associe aux KAR et qui, sous une forme

20 tyrosine phosphorylée, s'associe à ZAP-70. KARAP est donc un nouvel élément de transduction des lymphocytes T et NK. Il est possible que KARAP ou des analogues de KARAP s'associent aussi aux isoformes activatrices des récepteurs à ITIM, et servent dans ces complexes multimoléculaires de sous-unité de transduction des signaux émis lors de

25 l'engagement du récepteur.

Une méthode particulièrement appropriée pour déterminer ou contrôler qu'un polypeptide candidat, dont on connaît la séquence, correspond à une protéine KARAP selon l'invention consiste à produire un anticorps contre une partie caractéristique de ce polypeptide candidat (par exemple une région

intracytoplasmique comprenant au moins un motif ITAM ou une région extracytoplasmique), et à vérifier que cet anticorps reconnaît, sur une cellule fonctionnelle, une cellule KAR<sup>+</sup> fonctionnelle par exemple, une cible qui se trouve associée au récepteur pour lequel le polypeptide candidat est supposé être le KARAP (c'est-à-dire, dans le cas de cellules KAR<sup>+</sup>, à vérifier que l'anticorps reconnaît une cible qui se trouve associée à un récepteur KAR).

Cette méthode d'identification de polypeptides KARAP selon l'invention consiste ainsi notamment à :

- produire un anticorps mono- ou polyclonal dirigé contre ce polypeptide candidat, et en particulier contre une région de ce polypeptide candidat qui comprend au moins un motif ITAM (par exemple, dans le cas de la protéine KARAP murine identifiée ci-dessus, un anticorps dirigé contre une région de la partie extracytoplasmique (SEQ ID n°3) ou de la partie intracytoplasmique (SEQ ID n°5) de la SEQ ID n°2),
- mettre en contact cet anticorps avec un lysat de cellules, possédant, sous une forme fonctionnelle, le récepteur activateur ou non inhibiteur pour lequel le polypeptide candidat est supposé constituer le KARAP, par exemple des cellules KAR<sup>+</sup> fonctionnelles telles que des cellules NK ou T, dans des conditions douces permettant des réactions de liaison de type antigène-anticorps,
- identifier le polypeptide candidat comme étant un polypeptide KARAP selon l'invention lorsque dans les produits de réaction éventuellement formés se trouvent un produit de masse moléculaire apparente proche de celle d'un KAR (environ 50 kDa) et un produit de masse moléculaire apparente proche de celle du polypeptide candidat notamment entre 10 et 16 kDa environ).

Cette méthode d'identification selon l'invention peut notamment être réalisée :

- en mettant en contact ledit anticorps comme ci-dessus décrit,



- faire précipiter les produits de réaction éventuellement formés dans des conditions douces de détergent préservant les complexes moléculaires (par exemple digitonine à 1%, voir exemple 1 ci-dessus),

- mesurer la masse moléculaire des produits précipités, par exemple  
5 par migration électrophorétique en présence des marqueurs de masse moléculaire sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, et

- en identifiant le polypeptide candidat comme étant un polypeptide KARAP selon l'invention comme ci-dessus décrit.

### 10 **EXEMPLE 3 :**

#### **1° Identification de plusieurs EST correspondant à KARAP.**

Notre stratégie de clonage de KARAP murin par bio-informatique,  
15 telle que présentée dans l'exemple 2 ci-dessus, révèle également l'existence de 5 EST (Expressed Tag Sequences) qui correspondent à notre définition de KARAP. Il s'agit des EST AA242315, AA734769, W88159, AA098506 et W41142. Les figures 10A à 14A illustrent les séquences ADNc, respectivement, des EST AA242315, AA734769, W88159, respectivement,  
20 AA098506 et W41142 (SEQ ID n°6 à SEQ ID n°10 respectivement). Les figures 10B à 14B illustrent les séquences protéiques correspondant, respectivement, à ces EST (SEQ ID n°11 à SEQ ID n°15 pour les protéines des EST AA242315, AA734769, W88159, AA098506 et W41142 respectivement). Tous ces EST ont été obtenus à partir de tissus provenant de  
25 souris C57Bl/6 et ont été alignés afin permis d'obtenir une séquence cDNA correspondant à un cadre de lecture ouvert. Ceci est illustré par la figure 15 qui représente l'alignement des séquences des EST AA098506 (SEQ ID n°9), AA242315 (SEQ ID n°6), W88159 (SEQ ID n°8), AA734769 (SEQ ID n°7)

et W41142 (SEQ ID n°10), et qui présente la séquence consensus résultante (ADNc KARAP murin consensus ; SEQ ID n°16).

Ceci est également illustré par la figure 16 qui représente l'alignement des séquences protéiques des EST AA242315 (SEQ ID n°11), W88159 (SEQ ID  
5 n°13), W41142 (SEQ ID n°15), AA098506 (SEQ ID n°14) et AA734769 (SEQ ID n°12), et qui représente la séquence consensus résultante (protéine KARAP murine consensus, SEQ ID n°17). Sur ces figures 15 et 16, le symbole "." indique une identité avec la séquence consensus considérée, le symbole "-" indique l'absence de données de séquençage.

10

## 2° Séquence génomique de KARAP murin

Une librairie (phage lambda, EMBL3) de DNA génomique isolée à partir de souris de la lignée de souris 129 a été criblée avec le cDNA correspondant à la séquence de l'EST AA734769 selon une technique classique. Un phage  
15 contenant un fragment de 18 kb a été identifié comme positif. Une cartographie de ce phage par coupure avec une série d'enzyme de restrictions a été effectuée et un fragment EcoRI-EcoRI de 9kb obtenu à partir du phage a été cloné dans le vecteur de clonage pBlue-Script et contient l'intégralité du gène KARAP murin (de l'ATG initial à la séquence STOP). La séquence de  
20 ce gène KARAP murin est présentée en figure 17 (SEQ ID n°18 ; 2838 pb).

De plus, des amorces oligonucléotides ont été générées afin d'obtenir l'organisation génomique de KARAP murin. Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau 1 ci-dessous (SEQ ID n°19 à SEQ ID n°26) :

25

Tableau I

Numéro d'identification	Orientafion	Position*	Sequence (5'-3')	SEQ ID n°
7134	Sens	60-81	GGC TCT GGA GCC CTC CTG GTG C	SEQ ID n°19
7132	Antisens	581-561	ACT CTG GGC CTG TAC GGG ACT	SEQ ID n°20
7133	Sens	561-581	AGT CCC GTA CAG GCC CAG AGT	SEQ ID n°21
7130	Antisens	800-780	CAG AGT CAA CAC CAA GTC ACC	SEQ ID n°22
7131	Sens	780-800	GCT GAC TTG GTG TTG ACT CTG	SEQ ID n°23
7128	Antisens	978-958	CTC AGT CTC AGC AAT GTG TTG	SEQ ID n°24
7129	Sens	958-978	CAA CAC ATT GCT GAG ACT GAG	SEQ ID n°25
7127	Antisens	2703-2683	CTG TGT GTT GAG GTC ACT GTA	SEQ ID n°26

\* Position selon la séquence génomique.

L'organisation génomique du KARAP murin est présentée en figure 18. Nous avons aussi obtenu à partir de ces données, la séquence cDNA et donc protéique de KARAP de souris de la lignée 129. Cette séquence cDNA (SEQ ID n°27) et cette séquence protéique (SEQ ID n°28) sont présentées en figure 19.

La séquence protéique ainsi traduite est:

MGALP SWCLLFLPVLTLVLGLSPVQA	Séquence signal
QSDTFP RCDCSSVPG	Domaine extracytoplasmique
VLGIVLGDVLTLTLLIALAYSLG	Domaine transmembranaire
RLVSPGQERTFKQHIAETESPYQELQGQRPEVYSDLNTQRQYYR	Domaine intracytoplasmique

L'ensemble de ces résultats de cartographie génomique montrent que le gène KARAP murin (de l'ATG initial à la séquence STOP) est long de 2,9 kb environ, et comprend 5 exons. Ces résultats sont illustrés par la figure 20 où sont représentés, de haut en bas, l'ADN génomique du KARAP murin de la souris 129 (en noir : exon traduit ; en hachures horizontales : exon non traduit, en blanc : intron), la séquence protéique correspondante (SEQ ID n°28 de l'exon n°1 à l'exon n°5), et la nature (SS = Séquence signal, EC = domaine extracytoplasmique ; TM = domaine transmembranaire ; IC = domaine intracytoplasmique) des différentes régions de cette protéine. L'exon 1 code pour une portion N-terminale de la séquence signal, l'exon 2 code pour le reste de la séquence signal et les trois premiers acides-aminés de la partie extracytoplasmique, l'exon 3 code pour le reste de la partie extracytoplasmique, la partie transmembranaire et les 9 premiers acides-aminés de la partie intracytoplasmique, l'exon 4 code pour 14 acides-aminés de la partie intracytoplasmique et l'exon 5 code pour le reste de la protéine. Comme attendu de l'organisation génomique d'un polypeptide à ITAM comme KARAP, l'ITAM est codé par deux exons (exon 4 et 5) séparés par un intron de type 0.

### **3° Reconstitution fonctionnelle d'un KAR (p50.2) exprimé dans les RBL-2H3 par le KARAP humain DAP-12.**

Nous avons obtenu le cDNA codant pour KARAP humain par RT-PCR en  
5 générant des amorces oligonucléotides déduite de la séquence de KARAP  
murin. Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau 2 ci-dessous  
(SEQ ID n°29 et n°30) :

10

15

20

25

Tableau 2

## Oligonucléotides human KARAP

N°	Identification	Orientation	Localisation	Sequence (5'-3')
7367	Sens	ATG (53)	CCGCTCGAGGGCTTCA	GGGGGACTTGAAC (SEQ ID n°29)
			Xho I	Codon initiation
7368	Antisens	398	CTAGTCTAGA GGATCC	AGGTATCATCTGCTGAC
			Xba I    Bam HI	GTGATTCG (398)
				(SEQ ID n°30)

\*Numérotation en fonction de la séquence cDNA murine (SEQ ID n°27).

La séquence de l'ADNc obtenu est présentée en figure 21 (SEQ ID n°31 : ADNc du KARAP humain). De l'ARN extrait à partir de clones NK humains KAR<sup>+</sup> a servi de base à la génération de ce cDNA. Ce cDNA a été cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pNT-neo et des transfectants stables pour ce KARAP humain ont été générés dans le transfectant KAR<sup>+</sup> (p50.2) de la lignée cellulaire RBL-2H3 (Bléry et al, J. Biol. Chem., 1997). La capacité des récepteurs KAR exprimés sur les cellules RBL-2H3 ainsi doublement transfectées p50.2<sup>+</sup> et KARAP<sup>+</sup>, à transduire un signal activateur a été testée par stimulation à l'aide d'anticorps dirigés contre la partie extracytoplasmique de p50.2 et en suivant le relargage de sérotonine tritiée.

Le protocole suivi pour cette expérience de relargage de sérotonine tritiée est le suivant :

Ces cellules sont décollées, centrifugées et resuspendues dans du RPMI-10% SVF à une concentration finale de  $1 \times 10^6$  cellules par ml. Les cellules sont alors incubées avec 2  $\mu$ Ci de sérotonine marquée au tritium par ml de cellules pendant 1 heure. Les cellules sont lavées puis remises dans du milieu pour 1 heure à 37°C afin qu'elles relarguent la sérotonine excédentaire de leurs stocks. Les cellules sont ensuite réparties dans des plaques à 96 puits (200000 cellules par puits) avec de l'IgE de souris (2682-I) ou un Ac anti-p50 (GL183). Les cellules adhèrent pendant 1 heure puis sont lavées. Elles sont remises à 37°C 15 minutes puis stimulées avec du F(ab')<sub>2</sub> GAM (50  $\mu$ g/ml). Les cellules sont laissées 30 minutes à 37°C pour leur permettre de libérer leur sérotonine. La réaction est terminée en ajoutant du HBSS froid et en mettant les cellules sur la glace. La moitié du surnageant de chaque puits est alors récupéré et mis dans 1ml de liquide de scintillation. Les 100% de dégranulation sont obtenus à partir du même volume de lysat obtenu à partir de cellules chargées en sérotonine et non stimulées. Les échantillons sont alors comptés sur un compteur  $\beta$ .

Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 22 qui présente le % de sérotonine relarguée dans le surnageant, par les cellules RBL-2H3 doublement transfectées p50/KARAP humain et stimulées par l'anticorps indiqué en abscisse, (à gauche : aucun anticorps ; au centre IgE de souris : mIgE 1/500 ; à droite : GL183 5µg/ml). Comme indiqué sur cette Figure 22, 5 alors que l'engagement de KAR dans RBL-2H3 par un anticorps réagissant avec la partie extracytoplasmique de KAR (l'anticorps monoclonal GL183) ne se traduit pas par l'activation des cellules, l'engagement de KAR par GL183 dans les doubles transfectants RBL-2H3 exprimant à la fois KAR et KARAP 10 humains, se traduit par l'activation cellulaire (objectivée ici par la libération de sérotonine à partir des cellules). Ceci est donc la preuve formelle que la séquence KARAP humaine identifiée reconstitue la fonctionnalité des KAR.

La figure 23 illustre l'homologie entre l'organisation du gène KARAP humain et celle du gène KARAP murin (E1 à E5 : exon 1 à exon 5 ; I1 à I4 : 15 intron 1 à intron 4). La numérotation des paires de bases du gène KARAP humain et de souris y est indiquée.



## REVENDICATIONS

1. Polypeptide isolé, caractérisé en ce qu'il permet la restauration d'une activation KAR déficiente,  
5 ou fragment, ou homologue, d'un tel polypeptide.
2. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est capable de s'associer à un KAR, et de ne pas s'associer à la contrepartie inhibitrice de ce KAR,  
10 ou fragment, ou homologue, d'un tel polypeptide.
3. Polypeptide tel qu'obtenu :
  - i. par immunoprécipitation d'une ou plusieurs fraction(s) polypeptidique(s) de lysats de cellules exprimant des récepteurs KAR  
15 capables de transduire un signal activateur à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR, tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,
  - ii. chaque fraction polypeptidique pouvant optionnellement être  
20 plus avant épuisée par élimination des fractions immunoprécipitées à l'aide d'anticorps anti-CD3 et/ou anti-Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ , et/ou être à nouveau précipitée à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,
  - 25 iii. par résolution des polypeptides de ladite (desdites) fraction(s) polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire, et récupération des polypeptides correspondant à un poids moléculaire de  $12 \pm 2$  kDa environ, ou bien

par résolution des polypeptides de ladite (desdites) fractions polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire après avoir soumis ladite (lesdites) fraction(s) polypeptidique(s) à un test kinase, et récupération des polypeptides phosphorylés correspondant à un poids moléculaire de 12, 14  
5 et/ou  $16 \pm 2$  kDa environ,  
ou fragment, ou homologue, d'un tel polypeptide.

4. Polypeptide selon la revendication 3, caractérisé en ce que lesdites cellules sont des cellules NK et/ou des cellules T et/ou des cellules myéloïdes et/ou  
10 des cellules B et/ou des mastocytes.

5. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que sa séquence en acides aminés :  
- présente au moins un acide aminé tyrosine phosphorylable,  
15 - présente une masse moléculaire comprise entre  $10 \pm 2$  et  $16 \pm 2$  kDa environ.

6. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que sa séquence en acides aminés comporte au moins un  
20 motif ITAM  $YxxL/Ix_{6-8}YxxL/I$ .

7. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que sa séquence en acides aminés comporte une région extracytoplasmique, une région transmembranaire, et une région  
25 intracytoplasmique.

8. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que sa séquence en acides aminés comporte au moins un acide aminé cystéine extracytoplasmique.

9. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que sa séquence en acides aminés comporte au moins un acide aminé chargé (R, K, D, E) transmembranaire.
- 5
10. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est phosphorylé au niveau d'au moins un résidu tyrosine.
- 10
11. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il se présente sous la forme de dimères.
12. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il se lie à une molécule à domaine SH2 ou PTB.
- 15
13. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que sa séquence en acides aminés est essentiellement constituée par la SEQ ID N°2, n°3, n°4, ou n°5, n°11, n°12, n°13, n°14, n°15, n°17, ou n°28.
- 20
14. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est modifié par glycosylation, phosphorylation, sulfonation, biotinylation, acylation, estérification, par addition, substitution ou suppression d'entités de forme moléculaire proche de celle des groupes
- 25
- phosphate telles que le phosphonate, par addition de réactifs de marquage tels que la luciférase, la GFP ou ses analogues (*Green Fluorescence Protein*), par addition de cibles de purification telles qu'un ligand d'affinité, par addition d'entités modifiant sa solubilité.

15. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est capable de traverser une membrane cellulaire.
16. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes,  
5 caractérisé en ce qu'il est modifié de telle sorte à inhiber sa capacité à transduire un signal.
17. Polypeptide selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il est modifié de telle sorte à être non hydrolysable dans des conditions biologiques,  
10 notamment par addition de groupes phosphonates.
18. Polypeptide selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il est modifié par substitution d'un résidu tyrosine par un résidu phénylalanine.
- 15 19. Anticorps ou fragment d'un tel anticorps, en particulier fragment Fc, Fv, Fab, F(ab)'2, CDR tel qu'obtenu par immunogénèse à partir d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, ou à partir d'un fragment d'un tel polypeptide.
- 20 20. Anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il est capable de reconnaître la SEQ ID n°2, SEQ ID n°3, SEQ ID n°4, SEQ ID n°5, SEQ ID n°11, SEQ ID n°12, SEQ ID n°13, SEQ ID n°14, SEQ ID n°15, SEQ ID n°17 et/ou SEQ ID n°28.
- 25 21. Acide nucléique ou variant d'un tel acide nucléique, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence correspondant à la lecture en cadre ouvert, selon le code génétique universel, de la séquence en acides aminés d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes.

22. Acide nucléique selon la revendication 22, ou variant d'un tel acide nucléique, caractérisé en ce que ledit acide nucléique présente une séquence essentiellement constituée par la SEQ ID n°2, n°6, n°7, n°8, n°9, n°10, n°16, n°27, n°31, ou n°18.

5

23. Procédé d'obtention d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes :

i. d'immunoprécipitation d'une ou plusieurs fraction(s) polypeptidique(s) de lysats de cellules KAR<sup>+</sup> à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR, tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,

ii. chaque fraction polypeptidique pouvant optionnellement être plus avant épuisée par élimination des fractions immunoprécipitées à l'aide d'anticorps anti-CD3 et/ou anti-FcεRIγ, et/ou être à nouveau précipitée à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,

iii. de séparation les polypeptides de ladite (desdites) fraction(s) polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire et récupérer les polypeptides correspondant à un poids moléculaire de  $12 \pm 2$  kDa environ, ou bien

de séparation des polypeptides de ladite (desdites) fraction(s) polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire après avoir soumis ladite (lesdites) fraction(s) polypeptidique(s) à un test kinase, et récupérer les polypeptides phosphorylés correspondant à un poids moléculaire de 12, 14 et/ou  $16 \pm 2$  kDa environ.

25

24. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que lesdites cellules KAR<sup>+</sup> sont des cellules NK et/ou des cellules T et/ou des cellules myéloïdes et/ou des cellules B et/ou des mastocytes.

5 25. Méthode pour l'obtention de la séquence d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, caractérisée en ce qu'on opère par criblage parmi des séquences candidates pour ne sélectionner que celle(s) qui :

- présente(nt) au moins un acide aminé tyrosine phosphorylable,
- 10 - présente(nt) une masse moléculaire comprise entre 5 et 25 kDa environ,
- comporte(nt) une région extracytoplasmique, une région transmembranaire, et une région intracytoplasmique,
- comporte(nt) au moins un acide aminé cystéine dans sa région
- 15 extracytoplasmique,
- comporte(nt) au moins un acide aminé chargé (R, K, D, E) dans sa région transmembranaire, et
- comporte(nt) au moins un motif ITAM YxxL/Ix<sub>6-8</sub>YxxL/I dans sa région intracytoplasmique, et que l'on s'assure que le(s) polypeptide(s)
- 20 correspondant à la (les) séquence(s) sélectionnée(s) est (sont) capable(s) de s'associer à un récepteur KAR tout en ne s'associant pas au récepteur contrepartie inhibitrice de ce KAR.

26. Méthode pour déterminer si un polypeptide candidat correspond à un

25 polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- produire un anticorps mono- ou polyclonal dirigé contre ce polypeptide candidat, et en particulier contre une région extracytoplasmique

de ce polypeptide candidat et/ou une région qui comprend au moins un motif ITAM.

- mettre en contact cet anticorps avec un lysat de cellules, possédant, sous une forme fonctionnelle, le récepteur activateur ou non inhibiteur pour lequel le polypeptide candidat est supposé constituer le KARAP dans des conditions douces permettant des réactions de liaison de type antigène-anticorps,

- identifier le polypeptide candidat comme étant un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 18 lorsque dans les produits de réaction éventuellement formés se trouvent un produit de masse moléculaire apparente proche de celle dudit récepteur activateur ou non inhibiteur, et un produit de masse moléculaire apparente proche de celle du polypeptide candidat.

27. Composition pharmaceutique comprenant, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable, une quantité efficace de polypeptides selon l'une quelconque des revendications précédentes, ou de fragments de tels polypeptides, ou une quantité efficace d'anticorps selon la revendication 19 ou 20, ou de fragments de tels anticorps, ou une quantité efficace d'acides nucléiques selon la revendication 21 ou 22, ou de variants de tels acides nucléiques.

28. Méthode de diagnostic *in vitro* d'un fonctionnement anormal ou non désiré d'une cellule, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes de:

- mise en contact d'au moins une cellule, ou un extrait de cellule, avec un anticorps selon la revendication 21 ou 22 ou un fragment d'un tel anticorps, ou avec un acide nucléique selon la revendication 21 ou 22 ou un variant d'un tel acide nucléique, et de

- révélation du produit de réaction éventuellement formé.

29. Méthode de diagnostic *in vitro* selon la revendication 28, caractérisée en ce que ledit fonctionnement anormal ou non désiré se traduit par une maladie immunoproliférative, une maladie d'immunodéficience telle qu'une maladie à  
5 VIH, un cancer tel que la maladie lymphoproliférative des lymphocytes granulaires, une maladie auto-immune telle que la polyarthrite rhumatoïde, une maladie infectieuse telle que le paludisme, une réponse allergique, un rejet de greffe.

10 30. Méthode d'identification de molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes de :

i. mise en contact des molécules candidates avec des polypeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 18 (ou avec des fragments de tels polypeptides), et de

15 ii. sélection de celles des molécules candidates pour lesquelles une liaison auxdits polypeptides (ou auxdits fragments de polypeptides) est observée.

31. Méthode d'identification de molécules capables de moduler une activité  
20 cellulaire résultant de l'activation d'un KAR, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes de :

i. mise en contact des molécules candidates avec des molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR telles qu'obtenues par la méthode selon la revendication 30 et avec des polypeptides selon l'une  
25 quelconque des revendications 1 à 18 (ou avec des fragments de tels polypeptides), et de

ii. sélection de celles des molécules candidates qui exercent un effet sur la liaison entre lesdits polypeptides (ou lesdits fragments de polypeptides)



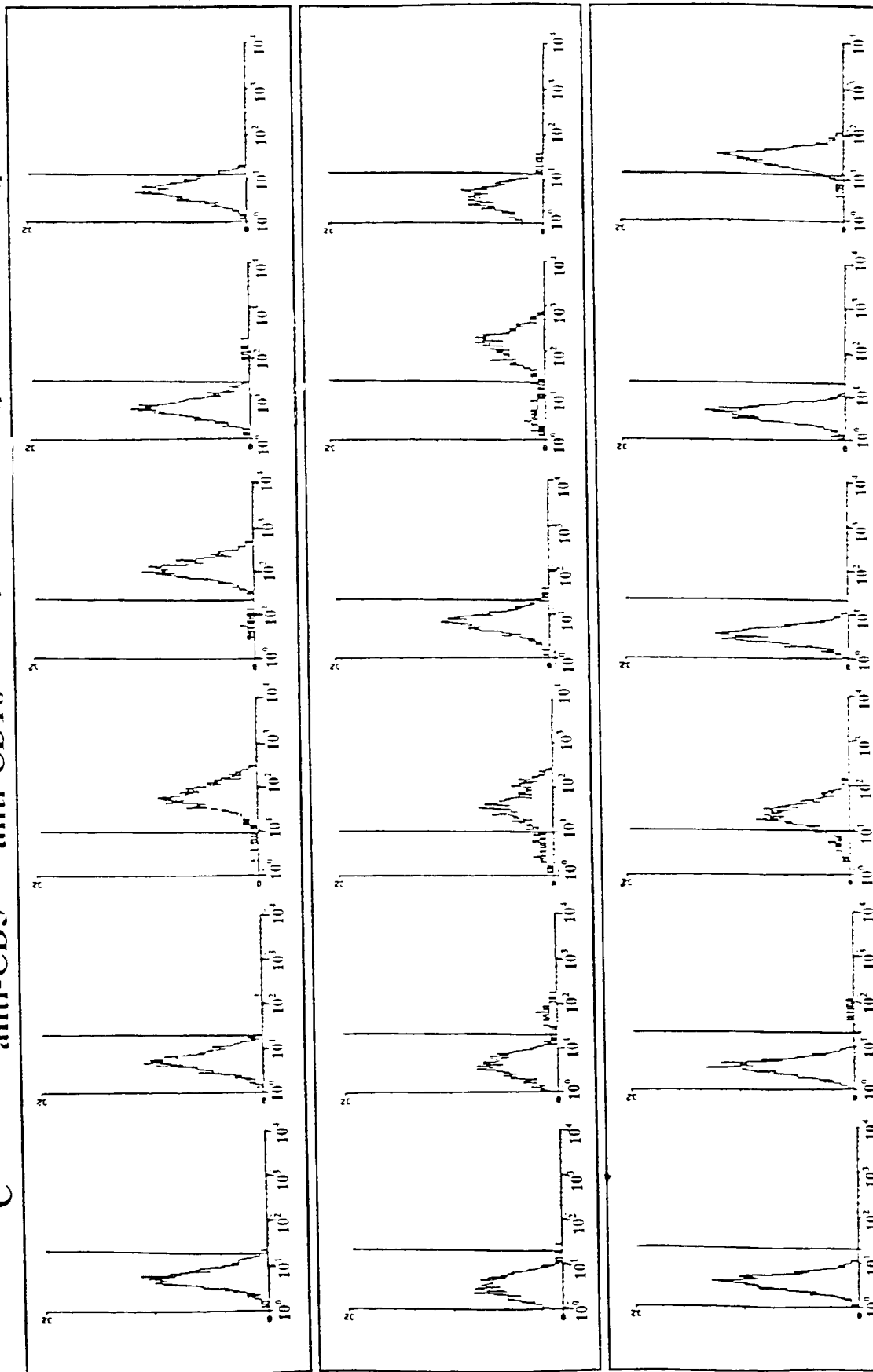
et lesdites molécules adaptatrices ou effectrices, telle qu'observée en l'absence desdites molécules candidates.



anti-CD158 anti-CD158 anti-CD158  
 (p50.1, EB6) (p50.2, GL183) (p50.3, PAX250)

C

anti-CD3 anti-CD16



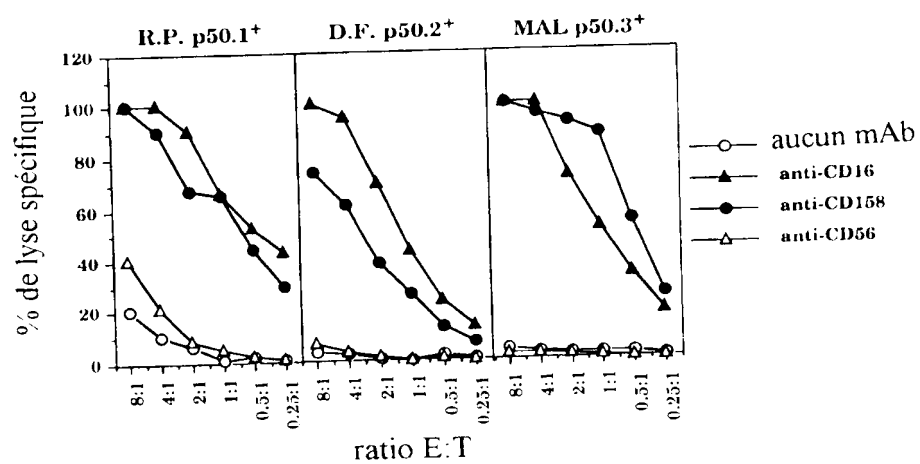
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Intensité de fluorescence

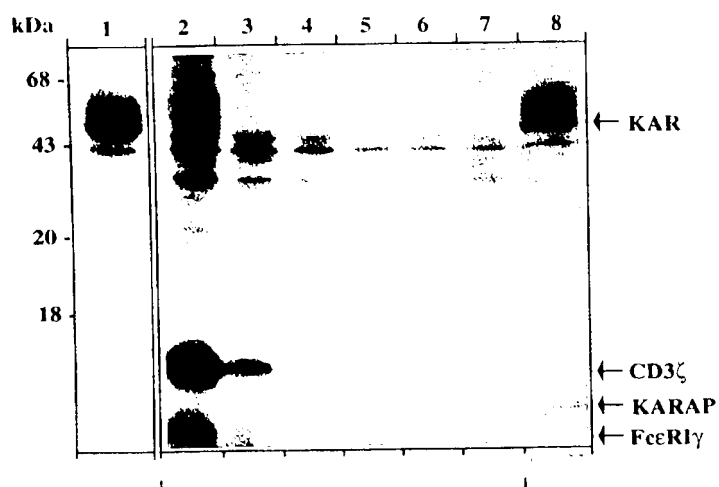
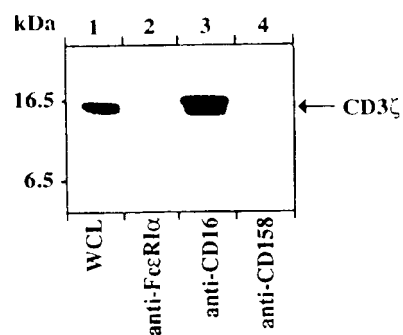
Figure 1A



2/26

**Figure 1B**

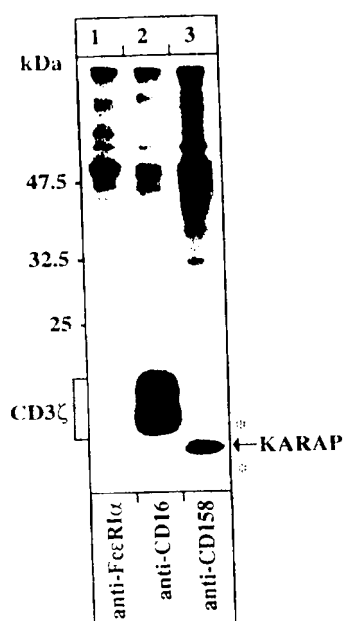
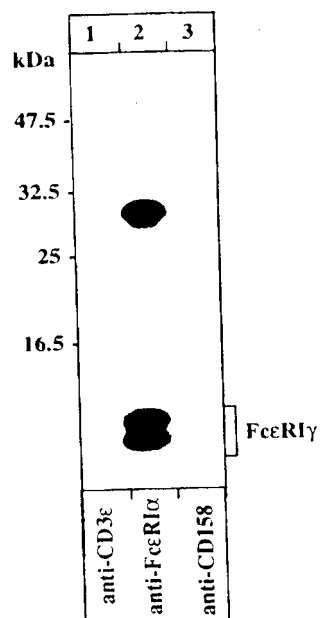
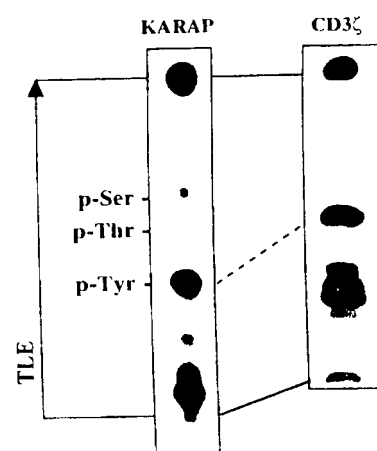


**Figure 2A****Figure 2B**



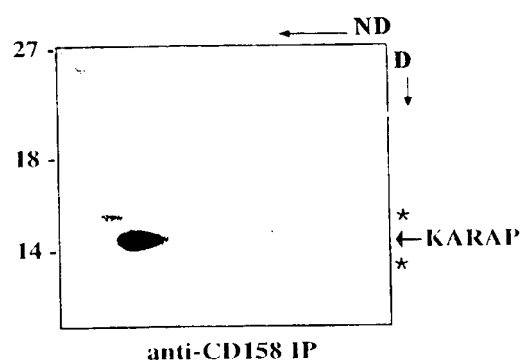


4/26

**Figure 3A****Figure 3B****Figure 3C**



5/26

**Figure 4**







# Récepteurs de cellules NK p58/50 pour des molécules du CMH de classe I

Figure 6

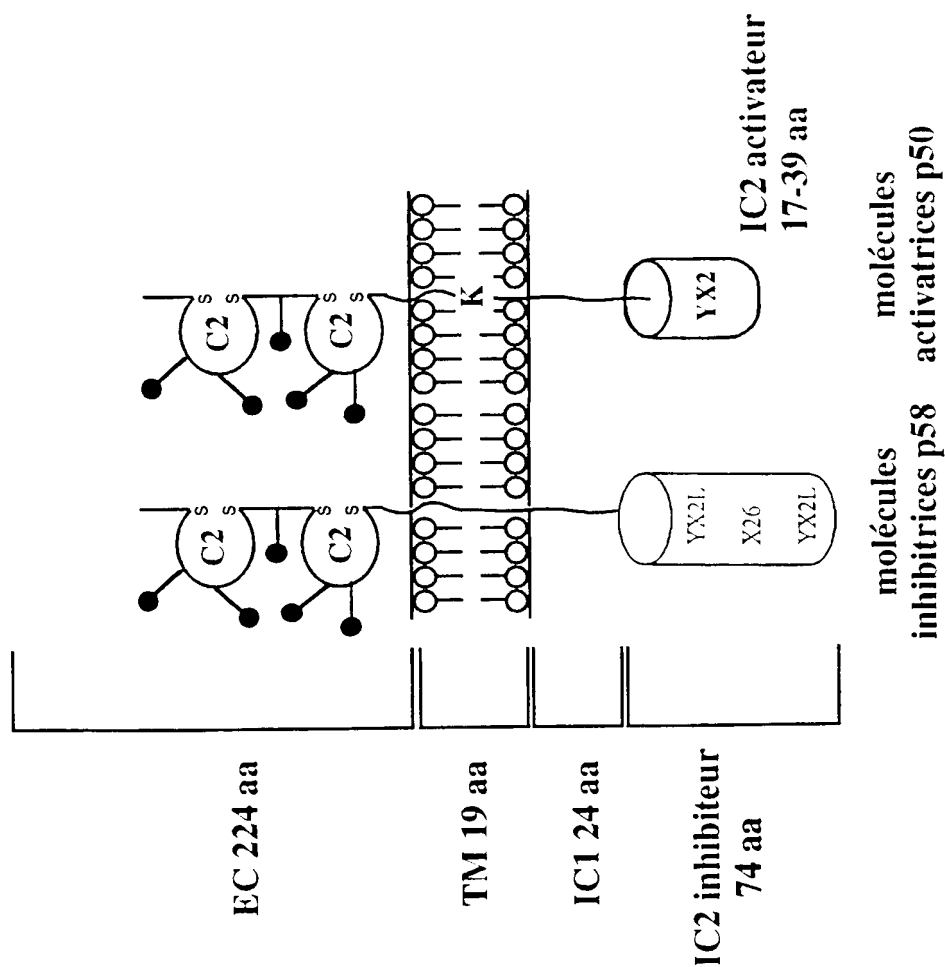






Figure 7

1 ggccacacca ggccacacca gcccctggac tgtggtgtcc agtgcatac tgccaccat  
61 ggggctctgg agcctcctgg tgcctctgt tcctctctgt cctctgact gtgggaggat  
121 taagtccgt acaggcccag agtgacact tcccaagatg cgactgttct tccgtgagcc  
181 ctggtgtact gtctgggatt gttctgggtg acttgggtgt gactctgctg attgccctgg  
241 ctgtgtactc tcggggccgc ctggtctccc gaggtcaagg gacagcggaa gggaccggga  
301 aacaacacat tctgagact ggtcgcctt atcaggagct tcagggtcag agacatgaag  
361 tatacagtga cctcaacaca cagaggcaat attacagatg agcccactct atgcccac  
421 gcggcctgat gcccgatcc ggtcattcca gatgcctact caacaagccc tctctgagat  
481 caggactccc gttggaatac agatccacag ggtacct



9/26

Figure 8

1/1

cag agt gac act ttc cca aga tgc gac tgt tct tcc gtg agc cct ggt gta ctg tct ggg  
 Q S D T F P R C D C S S V S P G V L S G

61/21

att gtc ctg ggt gac ttg gtg ttg act ctg ctg att gcc ctg gct gtg tac tct ctg ggc  
 I V L G D L V L T L L I A L A V Y S L G

121/41

cgc ctg gtc tcc cga ggt caa ggg aca gcg gaa ggg acc cgg aaa caa cac att gct gag  
 R L V S R G Q G T A E G T R K Q H I A E

181/61

act gag tgg cct tat cag gag ctt cag ggt cag aga cat gaa gta tac agt gac ctg aac  
 T E S P Y Q E L Q G Q R H E V Y S D L N

241/81

aca cag agc caa tat tac aga

T Q R Q Y Y R

31/11

91/31

151/51

211/71



Figure 9

Les polypeptides à ITAM	
CD3 $\zeta_1$	YneLnlgrrree-YdvL
CD3 $\zeta_2$	YneLqkdkmaeaYseI
CD3 $\zeta_3$	YqgLstatkdt-YdaL
CD3 $\gamma$	YqpLkdreddq-YshL
CD3 $\delta$	YqpLrdrrdaq-YshL
CD3 $\epsilon$	YepIrkgqrdl-YsgL
Ig $\alpha$ (CD79a)	YedIsrglggt-YqdV
Ig $\beta$ (CD79b)	YegLdidqtat-YedI
Fc $\epsilon$ RI $\gamma$	YtgLdtrnqet-YetL
Fc $\epsilon$ RI $\beta$	YeeLnlysat--YseL
KARAP	YqeLggqrhev-YsdL
Consensus	Y--L-----Y--L I I



Figure 10A

SEQ ID n°6

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
TCACACCAGG	TCCACCCAGC	CCCTGGACTG	TGGTGTCCAG	TGCATATCTG	50
GCCACCATCG	GCTCTCGGAG	CCTCCTGGTG	CCTTCTGTTC	CTTCCTGTCC	100
TCTGACTCT	GGCAGCATTA	AGTCCCGTAC	ACGCCGACAG	TGACACTTTC	150
CCAGATGCG	ACTGTTCTTC	CGTGAGCCCT	GGTGTACTGT	CTGGGATTGT	200
TCTGGGTGAC	TTGGTGTGGA	CTCTGCTGAT	TGCCCCGGCT	GTGTACTCTC	250
TGGCCCCGCT	GGTCTCCCGA	GGTCAACGGA	CACCGGACGG	GACCCCGAAA	300
CAACACATTG	CTGAGACTGA	GTCGCCATTAT	CAGGAGCTTC	AGGGTCAGAG	350
ACATGAAGTA	TACAGTGACC	TCAACACACA	GGCCCATAT	TACAGATGAG	400
CCCCTCTAT	GGCCATCAGC	GGCGTGATGC	CCCGATCCGG	TCAATCCAGA	450
TGCGTACTCA	ACGAGCCCTC	TCTGAGATCA	GGACTCCCGT	TGGATATACG	500
ATCCACAGGG	TACCT				515

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
SHQVPFARGL	WCFVHIWPFW	GSGASWCLLF	LPVLLTVGGL	SPVQAQSDTF	50
PRDCSSVSP	GVLSGIVLGD	LVLTLLIALA	VYSLGRLVSR	GQGTAEGRK	100
QHIAETESPY	QELQGQRHEV	YSLINTQRQY	YRXAHMPIS	GLMPGSGISR	150
CLINKPSLRS	GLPLEYRSTG	Y			171

Figure 10B

SEQ ID n°11





12/26

Figure 11A

SEQ ID n°7

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GTGCATATCT	GGCCACCATTG	GGGCTCTGCG	AGCCTCCATTG	GTGCCTTCTG	50
TTCTTCTCTG	TCTTCTTGAC	TGTGGGAGGA	TTAAGTCCCG	TACAGCCCCA	100
GAGTGACACT	TTCCCAAGAT	GCGACTGTTC	TTCCGTGAGC	CCTGGTGTAC	150
TGGCTGGGAT	TGTTCTGGGT	GACTTGGTGT	TGACTCTGCT	GATTGCCCTG	200
GCTGTGTACT	CTCTGGGCCG	CCTGGTCTTC	CGAGGTCAAG	GGACAGCGGA	250
AGGGACCCCG	AAACAACACA	TTGCTGAGAC	TGAGTCCCTT	TATCAGGAGC	300
TTCAAGGTCA	GAGACAGAA	GTATACAGTG	AACCAACAC	ACAGAGGCAA	350
TATTACAGAT	GAGCCCACTC	T			371

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
AYLATMGALF	FFWCLLFLPV	LLTVGLSPV	QAQSDTFPRC	DCSSVSFGVL	50
AGIVLGDLML	TLIALAVYS	LGRLVSRQCG	TAEGRKQHI	AETESFYQEL	100
QGQRPEVYSD	LNTQRQYYRX	AHS			123

Figure 11B

SEQ ID n°12



13/26

Figure 12A

SEQ ID n°8

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GCGTTCGTGT	CCTTCCCTGC	CTCCCTGACTG	TGGGAGGATT	AAGTCCCGTA	50
CAGGCCCAGA	GTGACACTTT	CCCAAGATCC	CGCTGTTCTT	CCGTGAGCCC	100
TGGTGTACTG	GCTGGGATTG	TTCTGGGCTGA	CTTGGGTGTTG	ACTCTGCTGA	150
TTGCCCCGGC	TGTGTACTCT	CTGGGCCCCC	TGGTCTCCCG	AGGTCAAGGG	200
ACAGCCGAAG	GGACCCGGAA	ACACACACTT	GCTGAGACTG	AGTCGCCCTTA	250
TCAGGAGCTT	CAGGGTCAGA	GACATGAAGT	ATACGTGAC	CTCACACAC	300
AGAGGCAATA	TTACAGATGA	GCCCCTCTTA	TGCCCATCAG	CGGCGTCATG	350
CCCCGATCCG	GTGATTCAG	ATGCTT			376

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
LLFLPVLLTV	GGLSPVQAQS	DTFPRCCCSS	VSPGVLAGIV	LGDLVLTLLI	50
ALAVYSLGRL	VSRGQGTAEQ	TRKQHLAETE	SPVQELQGR	HEVYSDINTQ	100
RQVYRXAHSM	PISGLMFGSG	HSRC			124

Figure 12B

SEQ ID n°13



14/26

SEQ ID n°9

Figure 13A

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
CCAGCCCCCTG	GACTGTGGTG	TCCAGTGCAT	ATCTGGCCAC	CATGGGGGCT	50
CTGGAGCCTC	CTGGTGCCCT	CTGTTCCTTC	CTGTCTCTCT	GACTGTGGGA	100
GGMTAAGTC	CCGTACAGGC	CCACAGTGAC	ACTTTCCCAA	GATGGGACTG	150
TTCTTCCGTG	AGCCCTGGTG	TACTGGCTGG	GATTGTTCCT	GCTGACTTGG	200
TGTTGACTCT	GCTGATTGCC	CTGGCTGTGT	ACTCTCTGGG	CCGCGCTGGC	250
TCCCGAGGTC	AAGGGACAGC	CGAAGGGACC	CGGAAACAAC	ACATTGCTGA	300
GACTGAGTGG	CCCTATCAGG	AGCTTCAGGG	TCAGACAGCA	GAGTATACAA	350
GTCACTTCAA	CACACAGAGG	CAATATTACA	GATGAGCCAC	TCTATGCCCA	400
TC					402

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
QPLDCGVQCI	SGHHGGSGAS	WCLLFLEVLL	TVGGLSPVQA	QSDTFPPCDC	50
SSVSPGVLAG	IVLGDLVLT	LLALAVYSLG	FLVSPGQGT	EGTRKQHLAE	100
TESFYQELQG	QRPEVYSDLN	TQRQYRXAT	LCP		133

Figure 13B

SEQ ID n°14



15/26

Figure 14A

SEQ ID n°10

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GTTCCTTCCT	GTTCCTCTGA	CTGTGGCAGG	ATTAAAGTCCC	GTACAGGCCC	50
AGAGTGACAC	TTTCCCAAGA	TGCGACTGTT	CTTCCGTGAG	CCCTGGTGTA	100
CTGGCTGGGA	TGTCTCTGG	TGACTTGGTG	TTGACTCTGC	TGATTGCCCT	150
GGCTGTGTAC	TCTCTGGCCC	GCTTGGTCTC	CCGAGGTCAA	GGGACAGCGG	200
AAGGCACCCG	GAAACAACAC	ATTGCTGAGA	CTGACTGCCC	TTATCAGGAG	250
CTTCAGGGTC	AGAGACCTGA	AGTATACAGT	GACCTCAACA	CACAGAGCGG	300
ATATTACAGA	TGAGCCCACT	CTATGCCCAT	CAGCGGCGCTG	ATGCCCGGAT	350
CCGGTCATTC	CAGTGGCTTA	CTCAACAAGC	CTTCTGTGTG	GATCAGGACT	400
CCCGTTGGAA	TACGATGCA	CAGGGTACCT	CCCTGAGATA	TCTGACATTG	450
TACCAATTCT	GTCCCCAAT	AGPAGACCGA	CA		482

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
FLPVLITVGG	LSPVQAQSDT	FFRCDCSSVS	PGVLAGIVLG	DLVLTLILAL	50
AVYSLGRIVS	EQGTAEGR	KQHIAETESP	YQELQQRPE	VYSDLNTQRR	100
YYPKAHSMPI	SLMPGSGHS	ROLLNKPFQ	IRTFVGIQIH	RVPPXDIYHC	150
TISVFKKATD					160

Figure 14B

SEQ ID n°15





16/26

**Figure 15**

SEQ ID n°9	AA098506	-----	-----	-----	-----	-----	35
SEQ ID n°6	AA242315	.....	.....	.....	.....	.....	50
SEQ ID n°8	W88159	-----	-----	-----	-----	-----	
SEQ ID n°7	AA734769	-----	-----	-----	-----	-----	11
SEQ ID n°10	W41142	-----	-----	-----	-----	-----	
SEQ ID n°16	Consensus	TCACACCAGG	TCCCACCAGC	CCCTGGACTG	TGGTGTCCAG	TGCATATCTG	50
AA098506	.....	.....	.....	.....	.....	.....	84
AA242315	.....	.....	.....	.....	.....	.....	98
W88159	-----	-----	-----	-----	-----	-----	19
AA734769	.....	.....	.....	.....	.....	.....	61
W41142	-----	-----	-----	-----	-----	-----	12
Consensus	GCCACCATGG	GGGCTCTGGA	GCCTCCATGG	TGCCTTCTGT	TCCTTCCTGT		100
AA098506	.....	.....	.....	.....	.....	.....	134
AA242315	.....	.....	.....	.....	.....	.....	148
W88159	.....	.....	.....	.....	.....	.....	69
AA734769	.....	.....	.....	.....	.....	.....	111
W41142	.....	.....	.....	.....	.....	.....	62
Consensus	CCTCCTGACT	GTGGGAGGAT	TAAGTCCCCT	ACAGGCCAG	AGTGACACTT		150
AA098506	.....	..A.....	.....	.....	..G.....		184
AA242315	.....	..A.....	.....	.....	..T.....		198
W88159	.....	..G.....	.....	.....	..G.....		119
AA734769	.....	..A.....	.....	.....	..G.....		161
W41142	.....	..A.....	.....	.....	..G.....		112
Consensus	TCCCAAGATG	CGRCTGTTCT	TCCGTGAGCC	CTGGTGTACT	GKCTGGGATT		200
AA098506	.....	.....	.....	.....	.....		234
AA242315	.....	.....	.....	.....	.....		248
W88159	.....	.....	.....	.....	.....		169
AA734769	.....	.....	.....	.....	.....		211
W41142	.....	.....	.....	.....	.....		162
Consensus	GTTCTGGGTG	ACTTGGTGTT	GACTCTGCTG	ATTGCCCTGG	CTGTGTACTC		250
AA098506	...G.....	.....	.....	.....	.....		284
AA242315	...G.....	.....	.....	.....	.....		298
W88159	...G.....	.....	.....	.....	.....		219
AA734769	...C.....	.....	.....	.....	.....		261
W41142	...G.....	.....	.....	.....	.....		212
Consensus	TCTSGGCCGC	CTGGTCTCCC	GAGGTCAAGG	GACAGCGGAA	GGGACCCGGA		300
AA098506	.....	.....	.....	.....	.....		334
AA242315	.....	.....	.....	.....	.....		348
W88159	.....	.....	.....	.....	.....		269
AA734769	.....	.....	.....	.....	.....		311
W41142	.....	.....	.....	.....	.....		262
Consensus	AACAACACAT	TGCTGAGACT	GAGTCGCCCTT	ATCAGGAGCT	TCAGGGTCAG		350
AA098506	....CA....	.....	.....	.....A..	.....		384
AA242315	....AT....	.....	.....	.....A..	.....		398
W88159	....AT....	.....	.....	.....A..	.....		319
AA734769	....CA....	.....	.....	.....A..	.....		361
W41142	....CT....	.....	.....	.....G..	.....		312
Consensus	AGACMWGAAG	TATACAGTGA	CCTCAACACA	CAGAGGCRAT	ATTACAGATG		400



## Figure 15 (suite)

AA098506	.....	.....	-----	-----	-----	402
AA242315	.....	.....	.....	.....	.....	448
W88159	.....	.....	.....	.....	.....	369
AA734769	.....	-----	-----	-----	-----	371
W41142	.....	.....	.....	.....	.....	362
Consensus	AGCCCACTCT	ATGCCCATCA	GCGGCCTGAT	GCCCGGATCC	GGTCATTCCA	450
AA098506	-----	-----	-----	-----	-----	402
AA242315	.....	.....	...C..A..	.....	.....	497
W88159	.....	-----	-----	-----	-----	376
AA734769	-----	-----	-----	-----	-----	371
W41142	.....	.....	...G..G..	.....	.....	412
Consensus	GATGCCTACT	CAACAAGCCC	TTCTSTGRGA	TCAGGACTCC	CGTTGGAATA	500
AA098506	-----	-----	-----	-----	-----	402
AA242315	.....	.....	-----	-----	-----	515
W88159	-----	-----	-----	-----	-----	376
AA734769	-----	-----	-----	-----	-----	371
W41142	.....	.....	.....	.....	.....	462
Consensus	CAGATCCACA	GGGTACCTCC	CTGAGATATC	TGACATTGTA	CCATTCTCTGT	550
AA098506	-----	-----	-----	-----	-----	402
AA242315	-----	-----	-----	-----	-----	515
W88159	-----	-----	-----	-----	-----	376
AA734769	-----	-----	-----	-----	-----	371
W41142	.....	.....	.....	.....	.....	482
Consensus	CCCCAAATAG	AAGACGGACA	-----	-----	-----	570



18/26

Figure 16

SEQ ID n°11	AA242315 protéine	SHQVFPAPGL	WCPVHIWPPW	GSGAS.....	.....	.....	.....
SEQ ID n°13	W88159 protéine	-----	-----	-----	-----	-----	-----
SEQ ID n°15	W41142 protéine	-----	-----	-----	-----	-----	-----
SEQ ID n°14	AAC98506 protéine	QPLDCGVQCT	SGHHG.....	GSGAS.....	.....	.....	.....
SEQ ID n°12	AA734769 protéine	AYL.....	ATMG.....	ALEPP.....	.....	.....	.....
SEQ ID n°17	Consensus	-----	-----	.....WCLLF	LPVLLTVGGGL	SPVQAGSD	.....
	AA242315 protéine	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....
	W88159 protéine	.....G.....	.....	.....	.....	.....	.....
	W41142 protéine	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	AAC98506 protéine	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	AA734769 protéine	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	Consensus	PRCICSSVSP	GVLAGIVLGD	LVLILLIALA	VYSLGRIVSR	GQGTAECT	.....
	AA242315 protéine	.....	.....H.....	.....	..X.....	.....	.....
	W88159 protéine	.....	.....H.....	.....	..X.....	.....	.....
	W41142 protéine	.....	.....	.....R.....	..X.....	.....	.....
	AAC98506 protéine	.....	.....	.....	..X.TL----	-----	-----
	AA734769 protéine	.....	.....	.....	..X.....	-----	-----
	Consensus	QHIAETESPY	QELCGQRPEV	YSDLNTQRQY	YR.AKSMPLS	GLHPGSGH	.....
	AA242315 protéine	..LLNKP..SL	RSGLPLEY..	.....	.....RSTGY	.....	.....
	W88159 protéine	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	W41142 protéine	..LLNKPFCGI	RTFVGIQIHR	VPEKDINHCQ	ISVPEKQTD	.....	.....
	AAC98506 protéine	.....	.....	.....CP.....	.....	.....	.....
	AA734769 protéine	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	Consensus	C-----	-----	-----	-----	-----	-----



Figure 17

SEQ ID n°18

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
ACACCACGTC	CCACCAGCCC	CTGGACTGTG	GTGTCCAGTG	CATATCTGGC	50
CACCATGGGG	GCTCTGGACC	CCCTCTGGTG	CCCTCTGGTG	CTTCTGTGCC	100
TCCGTACTGT	GGAGGTGAGT	CGGGGGGGCT	CTGTGGATGC	CTCCTGTGTC	150
CTCAGTTCAT	GTGGGGGCGA	GGACTAGGCA	GAGAGCAGCA	ACCGACTGCA	200
CAGACAGGG	GAAGGCTGGG	CAGAAGAAGG	TTCTCTTAGA	CCCTGTGGCT	250
TTCACTCTGA	CCTAGAGGCC	CTGAGATTGG	GAACCTGGTA	GTATCAGTAG	300
GGGGGACATT	GAAGCTCACA	GATATACCTA	CCACATGTTG	GTCAGTACCG	350
GCCCTTGGGT	GCTGTGAGAC	CAGCTCTTTC	CAACCTTCTT	CACTTCTTAC	400
ATCCACTGTC	TGTGGCTCAA	TTTACATCTT	TCTTTTGAAT	ATAGAATCAC	450
ATATAGCCCA	GGCTAGCTTC	AAATTTGCTA	CGTAATTGAG	GATPACCTCA	500
ACCTTTCTAT	TCTCTGTCTC	CACCTCTCTC	AGTTTACCTG	TTCTTTTCTC	550
CTTAGGATTA	AGTCCCGTAC	AGGCCCAGAG	TGGTAAGCCA	TAATACCCCC	600
GATCTTCTCT	TCTTCTCTCT	AAAGACCTCC	TCAGCCCAAC	CCCTCTCTCT	650
CTAGCCCTCT	TTGTCTTAAC	ACCAAGCCCT	GATTGTTAAC	CTGTGTCCCC	700
CTCTTCATCC	TCTCTGAGCA	CTTCTCCAG	ATCCGACTGT	TCTTCCGTGA	750
GCCCTGGTGT	ACTGGCTGGG	ATTCTTCTGG	GTGACTTGGT	GTGTACTCTG	800
CTGATTGCCC	TGGCTGTGTA	CTCTCTGGCC	CGCCTGGTCT	CCCGAGGTCA	850
AGAGAGTAAG	AAGGTAAATA	AATCTTTAAA	AAAAATTGTC	CCAGTCCCCA	900
GCTTAGTCCCT	TCTTCACACC	ATATGTCACT	CTCTATCCCT	CTCTAGGGAC	950
CCGGAAACAA	CACATTGCTG	AGACTGAGTC	GCTTATCAG	GTAAGAAGGC	1000
CAAAATCTTC	TCCAGCCCTTG	CTCTCTCCCC	GTCTCTGGTA	TCCCTCTCCC	1050
CAGTACAGAC	ACACAGACAA	ACACACACAC	ACAAATACAC	AGAGACATAT	1100
ATAACACAC	TCACATAAAT	AAACACACAC	ACATACCTAC	ACACACACAC	1150
ACACATACTT	ACACACACAC	ACACACATAC	CTACACACAC	ACACACACAC	1200
ACACACACAC	ACTACCCCTTC	CCAGAACCCT	AAGGTCCCTT	CCCTCAGGAGC	1250
TCCCCCAATC	CTGAAGGCAA	AGGACTAACT	GTCAAACATA	TTCCGTGGTC	1300
AACCATGACC	TTTAAGCTCA	GCTTCTAATG	AGTCTCTTGT	CAAGATTCTA	1350
TTCTCTCTCT	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	1400
TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	1450
GGTATATAAG	GGACATCAAA	TCCTATCTTT	ACCTTATTTT	TAAATGCGCA	1500
CTGATTTTGC	TCTGTATTTA	CATGTGTGTG	TGGAGCAGGT	GTGCATATGC	1550
ACTGGCAGCC	ATGTGGGGGT	CAGAAGACAA	CCCGTGGGGG	CTGGTCTCTT	1600
CCTTCCACCT	TGTGGATCTC	TGAACTCTAA	ATTCTAGTTG	TCAAGCTTGG	1650
CAGCAAGTGC	TTTACCCACT	GAACCATCTC	ACCAGCCCCA	AGCTCTCTTC	1700
CTAACCTTTG	GGCTCTGGGT	GAGGCTATGT	CTCTAGGGAA	ACACACACCA	1750
GGCTGGTCTC	TGGTACATGC	TCTCAGAGAC	TCTGCCCCCTG	GGAGGCACAG	1800
ACCCCTGCTC	TGTGACCCAA	TTTCTGGAAG	TCTACCTCCC	TCCCTGTAGC	1850
CAGTTTTGCC	CATTCGACTG	ACTCCTTGGT	CGAGGAACCT	TTTCTCTGAA	1900
AAGTGTWAGA	ATCTATTGAT	TCTGTGTTTG	AGTTTGGTGT	GGGGAAGTAG	1950
TGGCGTGTGT	CTTTAATCCC	AGGCTCTGGG	TGGCAGAGGT	ACCCAGATCT	2000
CTGTGAATTT	GAGGCTGGCC	TGGTCTACAG	TGTGAGTTCC	TGGACAGGCA	2050





20/26

Figure 17 (suite)

SEQ ID n°18 (suite)

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GGGCTACCCA	AAGAAACCOCT	GTCTACAAGC	AAACAAACAA	ACAAAAACAA	2100
AAACAAACAA	AAAAGAATCT	CAATATTGGC	CATCTGATGT	CCACAAGACC	2150
CCGGGCTGTC	TAGTTTUTGA	GACCCAGGAA	ACTTTAGGGC	AAATGTCACC	2200
CTGATTTTTT	TATCCTTCGG	TATCTTGGTT	GAGGCTTACA	TGGATCAACA	2250
CAGCACTCCA	ATTGGAGAAG	CTTATTTGAA	GCAACTTAAC	AAAATCATTT	2300
GGGGTGACAT	TATGAAGAGA	TTGAAGTGAA	CCATATTAAT	GCTGGGACAG	2350
GAAAGAAACT	GAAGTCCGG	AAACTAAAC	ATTGCCAACA	CTCAAAGGGT	2400
GAGCAGGTTG	AAGATCTGTG	GGCTTGGTGC	TCCAGGCATC	GGGGTGGGGG	2450
GGTGCACATG	TAGGAACCOCT	GGGGTGGGTG	CCCAATGTGC	AGGCAGAAAG	2500
GCCAGGAGAA	TGCTGASTGC	ATTTGAAATA	AACTTTGACC	TTTTCATGAT	2550
TTTAAAGTTG	AAAAACCTGC	CAGACACOTT	GAAGGTCAAT	AGTAGGCTAG	2600
ATTGTGTTTT	ATTGCTGGG	CCCCCTCCAA	TGATGGCCTT	TTTTTTTTTT	2650
TTTAAAGGAC	TTCAAGGTCA	GAGAACCAGAA	GTATACAGTG	ACCTCAACAC	2700
ACAGACGCCAA	TATTACAGAT	GAGCCCACTC	TATGCCCATC	AGCCGGCCTGA	2750
TGCCCCGATC	GGGTCAATCC	AGATGCCATC	TCAACAAGCC	CTCTCTGAGA	2800
TCAGGACTCC	CGTTGGAATA	CAGATCCACA	GGGTACCT		2838



21/26

Figure 18

sequence 3' Intron  
(site donneur)

Sequence Exon

Sequence 5' Intron  
(site accepteur)

MetGly                      alGluG  
ATGGGG...-Exon 1-...TCGAGG

GAGGTGA....

....TCCTTAG

lyLeuS                      lnSerA  
GATTAA...-Exon 2-...AGAGTG

GTAAGCC....

....TCCTGAG

spThrP                      lnGluA  
ACACTT...-Exon 3-...AAGAGA

GTAAGAA....

....TCTCTAG

rgThrA                      TyrGln  
GGACCC...-Exon 4-...TATCAG

GTAAGAA....

....TTTTAAG



22/26

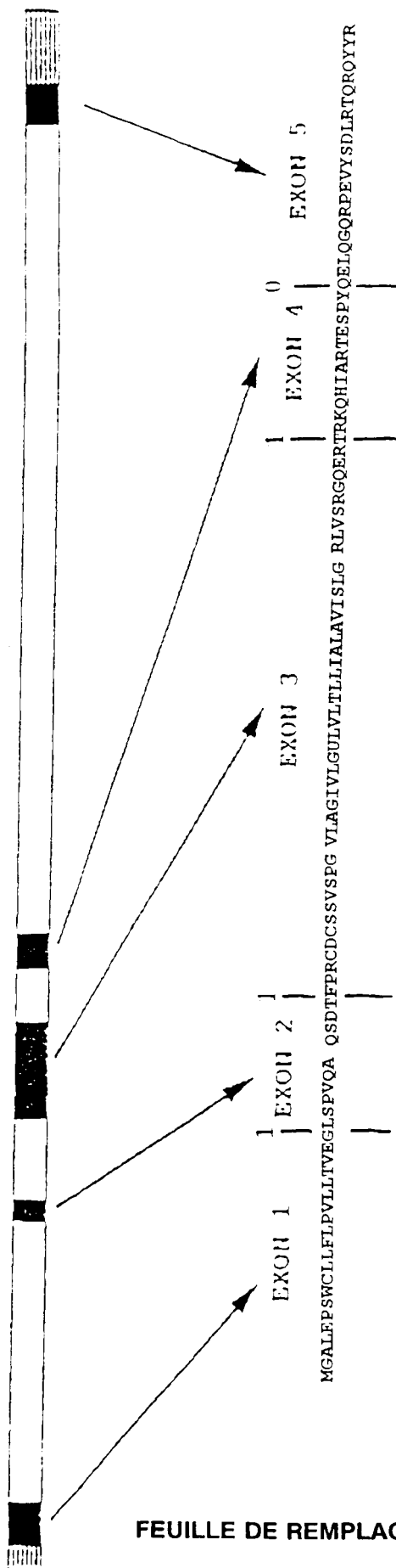
Figure 19

	10	20	30	40	50	
SEQ ID n°27	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
SEQ ID n°28	ATGGGGGGCTC	TGGAGCCCTC	CTGGTGCCTT	CTGTTCCCTC	CTGTCCTCCT	50
	M G A L E P S	W C L L F L P	V L L			
	GACTGTGGAG	GGATTAAGTC	CCGTACAGGC	CCAGAGTGAC	ACTTTCCTCAA	100
	T V E G L S P	V Q A Q S D	T F P R			
	GATGCGACTC	TTCTTCCGTG	AGCCCTGGTG	TACTGGCTCG	GATTGTTCTG	150
	C D C S S V	S P G V L A G	I V L			
	GGTCACTTGG	TGTTGACTCT	GCTGATTGCC	CTGGCTGTGT	ACTCTCTGGG	200
	G D L V L T L	L I A L A V Y	S L G			
	CCGCCTGGTC	TCCCGAGGTC	AAGAGAGGAC	CCGGAACCAA	CACATTGCTG	250
	R L V S R G Q	E R T R K Q	H I A E			
	AGACTGAGTC	GCCTTATCAG	GAGCTTCAGG	GTCAAGAGACA	TGAAGTATAC	300
	T E S P Y Q	E L Q G Q R H	E V Y			
	AGTGACCTCA	ACACACAGAG	GCAATATTAC	AGATGAGCCC	ACTCTATGCC	350
	S D L N T Q R	Q Y Y R . A H	S M P			
	CATCAGCGGC	CTGATGCCCG	GATCCGGTCA	TTCCAGATGC	CTACTCAACA	400
	I S G L M P G	S G H S R C	L L N K			
	AGCCCTCTCT	GAGATCAGGA	CTCCCGTTGG	AATACAGATC	CACAGGGTAC	450
	P S L R S G	L P L E Y R S	T G Y			
CT						452



Figure 20

 exon traduit    
  exon non traduit    
  intron



SS	EC	TM	IC
----	----	----	----





Figure 21

SEQ ID n°31

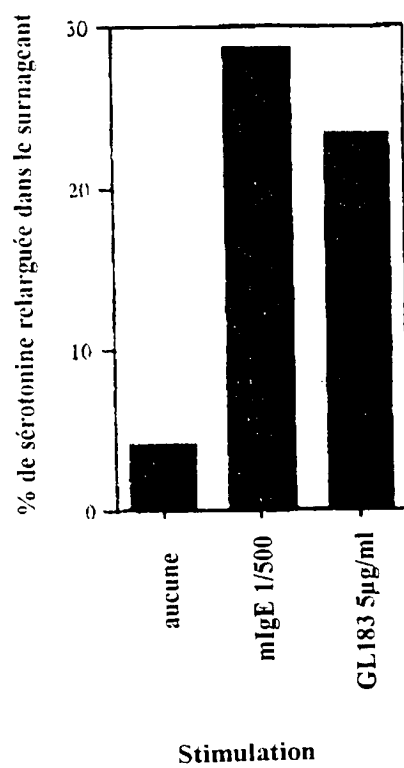
10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GGCTTCGTTT	TCTGTTCTEC	GCCGTTACAG	ATCCAAGCTC	CTCGAGGGCT	50
<hr/>					
TCATGGGGGG	ACTTGAACCC	TGCAGCAGGC	TCCTGCTCCT	GGCTCTCCTG	100
Codon Initiation					
CTGGCTGTAA	GTGGTCTCCG	TCCTGTCCAG	GCCCAGCCCC	AGAGCGATTG	150
CAGTTGCTCT	ACGGTGAGCC	CGGGCGTGCT	GGCAGCGATC	GTGATCGGAG	200
ACCTGGTGCT	GACAGTGCTC	ATTGCCCTGG	CGGTGTACTT	CCTGGGCGCG	250
CTGGTCCCTC	GGGGGCGAGG	GGCTGCGGAG	GCAGCGACCC	CGAAACAGCG	300
TATCACTGAG	ACCGAGTCCG	CTTATCAGGA	GCTCCAGGGT	CAGAGGTCCG	350
ATGTCTACAG	CGACCTCAAC	ACACAGAGGC	CGTATTACAA	ATGAGCCCCGA	400
Stop					
ATCATGACAG	TCAGCACAAT	GATACCTGGA	T		431



25/26

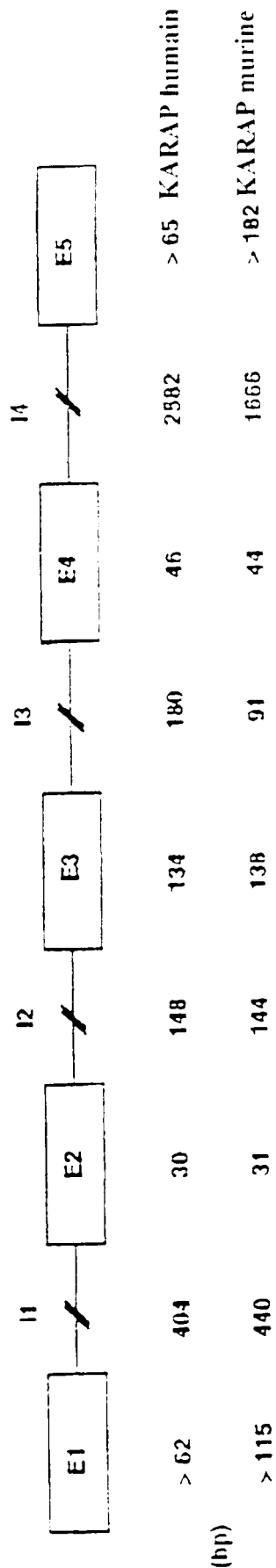
Figure 22

**Relargage de sérotonine induit par le complexe  
p50/KARAP reconstitué dans des cellules RBL-2H3**





26/26

Figure 23



1-12

## PCT

09/403980

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Reference du dossier du déposant ou du mandataire 59269-814	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA 220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 98/ 00883	Date du dépôt international (jour, mois, année) 30/04/1998	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour, mois, année) 30/04/1997
Déposant  INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA .....et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend .....3..... feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

2. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

3. ☒ La demande internationale contient la divulgation d'un listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés et la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage de séquence

☐ déposé avec la demande internationale

☒ fourni par le déposant séparément de la demande internationale

☐ sans être accompagnée d'une déclaration selon laquelle il n'inclut pas d'éléments allant au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle qu'elle a été déposée.

☐ transcrit par l'administration

4. En ce qui concerne le titre, ☐ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☒ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

POLYPEPTIDES ASSOCIES A DES RECEPTEURS ACTIVATEURS ET LEURS APPLICATIONS BIOLOGIQUES

5. En ce qui concerne l'abrégé,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrége est la suivante:

Figure n° ..... ☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☐ Aucune des figures n'est à publier.





## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/12 C07K14/705 C07K16/28 C07K1/36 A61K38/17  
G01N33/53 G01N33/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	M. BLÉRY ET AL.: "Reconstituted killer cell inhibitory receptors for major histocompatibility complex class I molecules control mast cell activation induced via immunoreceptor tyrosine-based activation motifs." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 14, 4 avril 1997, pages 8989-8996, XP002052877 BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS voir page 8994, colonne de droite, ligne 35 - page 8995, colonne de gauche, ligne 7 ---	2-4,7, 15,28-31
A	WO 95 20604 A (SCHERING CORP. ET AL.) 3 août 1995 voir page 41, ligne 7 - page 44, ligne 13 voir revendications --- -/--	1-31



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 février 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26/02/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040. Tx: 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Nooij, F



## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie	Identification des documents cites, avec le cas echeant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visees
P.X	<p>L. OLCESE ET AL.: "Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells."</p> <p>THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 158, no. 11, 1 juin 1997, pages 5083-5086, XP002052878 BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS voir le document en entier -----</p>	1-31



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/00883

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9520604	A	03-08-1995	AU 1908395 A	15-08-1995
			US 5770387 A	23-06-1998
-----				





## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/12, C07K 14/705, 16/28, 1/36,</b> <b>A61K 38/17, G01N 33/53, 33/68</b>	<b>A3</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 98/49292</b>  <b>(43) Date de publication internationale: 5 novembre 1998 (05.11.98)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR98/00883  <b>(22) Date de dépôt international:</b> 30 avril 1998 (30.04.98)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 97/05411                      30 avril 1997 (30.04.97)                      FR 98/00927                      28 janvier 1998 (28.01.98)                      FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> VIVIER, Eric [FR/FR]; 20 bis, chemin du Boudard, F-13260 Cassis (FR). MORETTA, Alessandro [IT/IT]; Via Nizza, 18/8, I-16136 Genova (IT). OLCESE, Lucia [IT/IT]; Via Palestro, 23/7A, I-16122 Genova (IT). VELY, Frédéric [FR/FR]; Résidence du Vallat La Farandole, F-13260 Cassis (FR). TOMASELLO, Elena [FR/FR]; 38, allée des Pins, F-13009 Marseille (FR).  <b>(74) Mandataires:</b> PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Armengaud Aîné, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>  <b>(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:</b> 27 mai 1999 (27.05.99)
<b>(54) Title: POLYPEPTIDES ASSOCIATED WITH ACTIVATOR RECEPTORS AND THEIR BIOLOGICAL APPLICATIONS</b>		
<b>(54) Titre: POLYPEPTIDES ASSOCIES A DES RECEPTEURS ACTIVEURS ET LEURS APPLICATIONS BIOLOGIQUES</b>		
<b>(57) Abstract</b>		
<p>The invention concerns novel means for diagnosing, preventing, compensating, treating an abnormal or unwanted functioning of KAR receptors (<i>Killer cell Activatory Receptor</i>), counterparts of non-inhibiting KIR receptors (<i>Killer cell Inhibitory Receptors</i>) of the immunoglobulin or lectin type. The invention concerns, in particular, novel KARAP (<i>KAR-Associated Proteins</i>) polypeptides and their biological applications. A KARAP polypeptide is naturally associated with a KAR receptor, and in the absence of such a KARAP, said KAR receptor is naturally incapable of transducing an activating signal that can be detected. The application also concerns methods for obtaining or identifying such KARAP polypeptides.</p>		
<b>(57) Abrégé</b>		
<p>La présente demande concerne de nouveaux moyens permettant de diagnostiquer, prévenir, pallier, traiter un fonctionnement anormal ou non désiré de récepteurs KAR (<i>Killer cell Activatory Receptor</i>), contreparties non inhibitrices de récepteurs KIR (<i>Killer cell Inhibitory Receptors</i>) de type immunoglobuline ou de type lectine. Elle est notamment relative à de nouveaux polypeptides KARAP (<i>KAR-Associated Proteins</i>) et à leurs applications biologiques. Un polypeptide KARAP, selon l'invention, est naturellement associé à un récepteur KAR, et en l'absence d'un tel KARAP, ledit récepteur KAR est naturellement incapable de transduire un signal activateur détectable. La présente demande vise également des méthodes d'obtention ou d'identification de tels polypeptides KARAP.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No

PCT/FR 98/00883

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C07K14/705 C07K16/28 C07K1/36 A61K38/17  
G01N33/53 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	M. BLÉRY ET AL.: "Reconstituted killer cell inhibitory receptors for major histocompatibility complex class I molecules control mast cell activation induced via immunoreceptor tyrosine-based activation motifs." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 14, 4 April 1997, pages 8989-8996, XP002052877 BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS see page 8994, right-hand column, line 35 - page 8995, left-hand column, line 7 ---	2-4,7, 15,28-31
A	WO 95 20604 A (SCHERING CORP. ET AL.) 3 August 1995 see page 41, line 7 - page 44, line 13 see claims --- -/--	1-31



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 February 1999

Date of mailing of the international search report

26/02/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00883

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>L. OLCESE ET AL.: "Human killer cell                      activatory receptors for MHC class I                      molecules are included in a multimeric                      complex expressed by natural killer                      cells."                      THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY,                      vol. 158, no. 11, 1 June 1997, pages                      5083-5086, XP002052878                      BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS                      see the whole document                      -----</p>	1-31

information on patent family members

PCT/FR 98/00883

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demi internationale No  
PCT/FR 98/00883

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/12 C07K14/705 C07K16/28 C07K1/36 A61K38/17  
G01N33/53 G01N33/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	M. BLÉRY ET AL.: "Reconstituted killer cell inhibitory receptors for major histocompatibility complex class I molecules control mast cell activation induced via immunoreceptor tyrosine-based activation motifs." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 14, 4 avril 1997, pages 8989-8996, XP002052877 BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS voir page 8994, colonne de droite, ligne 35 - page 8995, colonne de gauche, ligne 7 ---	2-4,7, 15,28-31
A	WO 95 20604 A (SCHERING CORP. ET AL.) 3 août 1995 voir page 41, ligne 7 - page 44, ligne 13 voir revendications --- -/--	1-31

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 février 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26/02/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Nooij, F

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No

PCT/FR 98/00883

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	<p>L. OLCESE ET AL.: "Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells."</p> <p>THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 158, no. 11, 1 juin 1997, pages 5083-5086, XP002052878 BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS voir le document en entier</p> <p>-----</p>	1-31

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

### Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem : internationale No

PCT/FR 98/00883

Document brevet cite au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9520604 A	03-08-1995	AU 1908395 A US 5770387 A	15-08-1995 23-06-1998
-----			





# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

REC'D 30 AUG 1999

WIPO PCT

### RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)


Référence du dossier du déposant ou du mandataire CP/FP/VB 59269-814	voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR98/00883	Date du dépôt international (jour/mois/année) 30/04/1998	Date de priorité (jour/mois/année) 30/04/1997
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/12		
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA... et al.		

- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 8 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 8 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☒ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 11/11/1998	Date d'achèvement du présent rapport 25.08.99
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. (+49-89) 2399-0 Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Fonctionnaire autorisé Chavanne, F N° de téléphone (+49-89) 2399





**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/00883

**I. Base du rapport**

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après *(les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.)* :

**Description, pages:**

1-49,50'                      version initiale

**Revendications, N°:**

1-25                      reçue(s) avec télécopie du                      21/06/1999

**Dessins, feuilles:**

1/26-26/26                      version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description,                      pages :  
☒ des revendications, n°s :                      26-31  
☐ des dessins,                      feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :



**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/00883

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

Nouveauté	Oui : Revendications 1-25
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-25
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-25
	Non : Revendications

**2. Citations et explications**

**voir feuille séparée**

**VI. Certain documents cités**

**1. Certains documents publiés (règle 70.10)**

et / ou

**2. Divulgations non écrites (règle 70.9)**

**voir feuille séparée**

**VII. Irrégularités dans la demande internationale**

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :

**voir feuille séparée**

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

**voir feuille séparée**



**V. Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. L'examen de la présente demande a été réalisé en assumant que la priorité revendiquée est valide. S'il devait se révéler que tel n'est pas le cas, un document intermédiaire deviendrait alors pertinent pour juger de la brevetabilité de l'objet de la présente demande.

2. Il est fait référence au document suivant:

D1: The Journal of Biological Chemistry  
Vol. 272, No. 14, pp. 8989-8996, 1997

3. Le document D1 indique que dans les cellules NK et T, les KARs font partie d'un complexe multimérique contenant des KARAPs qui seraient nécessaires à leur fonction activatrice (page 8995, colonne 1, premier paragraphe). D1 indique que la contrepartie inhibitrice des KARs, les KIRs, ne sont pas impliqués dans de tels complexes multimériques dans les cellules NK et T (page 8995, colonne 1, paragraphe 2), ce qui implique que les KARAPs, associés aux KARs dans les cellules NK et T, ne s'associent pas aux KIRs. D1 décrit la reconstitution fonctionnelle de KARs dans des cellules de type non-lymphoïde, les cellules RTIIB, et montre que les KARs ainsi reconstitués ne sont pas fonctionnels, alors qu'ils le sont dans les cellules NK et T (page 8989, colonne 2, troisième paragraphe à page 8990, colonne 1, premier paragraphe).  
L'objet des revendications 1 et 2 est un polypeptide KARAP, ou homologue ayant la même fonction. Un tel homologue, capable de s'associer à un KAR et de ne pas s'associer à la contrepartie inhibitrice de ce KAR, est décrit dans D1. Bien que D1 ne décrive pas l'isolation des KARAPs, la présente autorité est d'avis que leur isolation peut être réalisée par l'homme du métier, compte tenu de l'association divulguée par D1 entre les KARs, connus, et les KARAPs. Par conséquent, les revendications 1-18 ne sont pas inventives (Art. 33(3) PCT).

4. L'obtention d'un anticorps reconnaissant un polypeptide connu dans l'état de la technique ou d'un acide nucléique codant pour la séquence en acides aminés





d'un tel polypeptide n'implique pas d'activité inventive. De plus, une méthode ou un procédé concernant un objet faisant parti de l'état de la technique, selon des étapes connues de l'homme du métier, n'implique pas d'activité inventive. Il en est de même pour une composition concernant un objet faisant parti de l'état de l'art et comprenant des éléments connus de l'homme du métier. Par conséquent, les revendications 13-25 ne sont donc pas inventives (Art. 33(3) PCT).

5. La présente demande présente également un défaut d'unité d'invention *a posteriori* au sens de l'Article 13.1 et 13.3 PCT pour les raisons suivantes:

Le concept commun reliant les différentes revendications indépendantes consiste en un polypeptide isolé permettant de transduire un signal provenant d'un KAR. Ce concept commun ne remplit pas les conditions de l'Article 33(3) PCT, son objet n'étant pas conforme au critère d'inventivité (voir ci-dessus). En conséquence, ce concept commun n'existe plus. La présente demande renferme donc onze inventions différentes non reliées par un concept inventif commun.

Chacune des inventions se réfèrent aux revendications 1-25 de manière partielle et correspond à un polypeptide différent permettant la transduction d'un signal provenant d'un KAR, sa séquence en acides aminés comprenant la SEQ ID No 2 (invention 1), 3 (invention 2), 4 (invention 3), 5 (invention 4), 11 (invention 5), 12 (invention 6), 13 (invention 7), 14 (invention 8), 15 (invention 9), 17 (invention 10), ou 28 (invention 11).

Cette objection de défaut d'unité ne sera pas poursuivie dans la présente phase d'examen, mais sera appliquée au cas où la présente demande entre en phase régionale Européenne,

## VI. Certains documents cités

Certains documents publiés (règle 70.10)

1. The Journal of Immunology  
Vol. 158, No. 11, pp. 5083-5086, 1997



**VII. Irrégularités dans la demande internationale**

1. La présente demande décrit d'une part, trois polypeptides phosphorylés capables de s'associer à des KARs, ayant un poids moléculaire apparent de 12, 14 ou 16 kDa, et d'autre part, un cDNA humain (SEQ ID No 31) codant pour un polypeptide permettant la restauration d'une activation KAR déficiente. La présente demande ne montre aucune évidence permettant de savoir si les trois phospho-polypeptides représentent un même polypeptide à différents degrés de phosphorylation et si le produit du cDNA humain (SEQ ID No 31) correspond à au moins un de ces phospho-polypeptides.

Il apparaît que le demandeur, assumant que les trois phospho-KARAPs et le produit du cDNA humain isolé correspondent à un seul et même polypeptide, revendique un polypeptide mélangeant certaines des caractéristique de chacun de ces polypeptides.

En conséquence, l'objet des revendications 1, 2, 7, 14, 16, 17, 19, 20 présente un manque d'évidence pour les raisons suivantes:

- A. La restauration de l'activité KAR déficiente n'ayant été démontrée que dans le cas du produit du cDNA humain, rien dans la description n'indique que les trois phospho-KARAPs puissent également restaurer une activation KAR déficiente (revendication 1). De plus, il n'y a également aucune évidence que la méthode d'isolation des trois phospho-peptides puisse être utilisée pour l'obtention du produit du cDNA humain (revendications 2 et 17).
- B. La présente demande ne présente aucune évidence que les trois phospho-KARAPs comportent:
- 1) un motif ITAM (revendications 1, 19 et 20)
  - 2) des régions extracytoplasmique, transmembranaire et intracytoplasmique (revendications 1 et 19)
  - 3) un acide aminé cystéine extracytoplasmique (revendications 1 et 19)
  - 4) un acide aminé chargé transmembranaire (revendications 1 et 19).
- C. La présente demande faisant référence à "un groupe similaire de KARAPs", Il y a des doutes qu'ils s'agissent des mêmes phospho-KARAPs que ceux précédemment mentionnés ainsi que sur l'incapacité de ces derniers à



s'associer à un KIR (page 34, lignes 15).

- D. Les trois phospho-KARAPs de 12, 14 et 16 kDa, et le polypeptide permettant la restauration de l'activité KAR déficiente sont tous des produits d'origine humaine. La présente demande ne montre ni la présence de tels phospho-KARAPs chez la souris, ni que des polypeptides murins (notamment ceux constitués par les SEQ ID No 2, 3, 4, 5, 11, 12, 13, 14, 15, 17 ou 28) permettent la restauration d'une activité KAR déficiente (revendications 7, 14 et 16).

### VIII. Observations relatives à la demande internationale

1. L'objet des revendications 1, 6 et 9-11 pour lequel protection est recherchée (un polypeptide) n'est pas clairement défini, du fait que celui-ci n'est pas défini par des caractéristiques techniques. En effet, ces revendications sont énoncées de telle manière que leur objet n'est défini que par le résultat à obtenir ("il permet...", "est capable de...", "se lie à...", "à inhiber...", "à être non hydrolysable..."). De telles définitions ne sont admissibles que dans les conditions prévues par les Directives C-III, 4.7. Les formulations ici utilisées ne sont cependant pas acceptables parce qu'il est possible de définir l'objet revendiqué dans des termes plus concrets, du fait qu'un polypeptide peut être clairement défini par sa séquence protéique, notamment.
2. La revendication 2 définit un polypeptide comme produit d'un procédé. Ce procédé également revendiqué en tant que tel (revendication 17) est confus et manque de clarté. De ce fait, il est permis de douter qu'il puisse être reproduit par l'homme du métier.
3. L'objet des revendications 3 et 18 n'est pas fondé sur la description. En effet, celle-ci ne décrit la présence de KAR que dans les cellules NK et T. Il n'est à aucun moment fait mention de cellules myéloïdes, de cellules B ou de mastocytes (Art. 6-fondement PCT).
4. La présente demande ne montre pas de liaison d'un quelconque polypeptide avec



une molécule à domaine PTB. La revendication 6 n'est donc pas fondée sur la description (Art. 6-fondement PCT).

5. La présente demande ne décrit aucun polypeptide modifié selon n'importe laquelle des revendications 8 et 10-12. Ces revendications ne sont donc pas fondées sur la description (Art. 6-fondement PCT).
6. La présente demande ne montre aucunement que l'un des polypeptides qu'elle décrit soit capable de traverser une membrane cellulaire. La revendication 9 n'est donc pas fondée sur la description (Art. 6-fondement PCT).
7. La revendication 19 décrit une méthode pour l'obtention de la séquence d'un polypeptide présentant notamment une masse moléculaire entre 5 et 25 kDa. Or, la présente demande ne décrit que des polypeptides ayant une masse moléculaire de 12, 14 ou 16 kDa. Par conséquent, la revendication de polypeptides ayant une masse moléculaire différente de ceux-ci n'est pas fondée sur la description (Art. 6-fondement PCT).





## REVENDEICATIONS

1. Polypeptide isolé, caractérisé en ce qu'il permet la restauration d'une activation KAR déficiente, en ce qu'il est capable de s'associer à un KAR, et de ne pas s'associer à la contrepartie inhibitrice de ce KAR, et en ce que sa séquence en acides aminés :

- présente au moins un acide aminé tyrosine phosphorylable,
- présente une masse moléculaire comprise entre  $10 \pm 2$  et  $16 \pm 2$  kDa environ,

- comporte au moins un motif ITAM  $YxxL/Ix_{6-8}YxxL/I$ ,
- comporte une région extracytoplasmique, une région transmembranaire, et une région intracytoplasmique,

- comporte au moins un acide aminé cystéine extracytoplasmique,
- comporte au moins un acide aminé chargé (R, K, D, E) transmembranaire,

ou fragment, ou homologue, d'un tel polypeptide, lesdits homologues ou fragments étant capables de transduire un signal provenant d'un KAR.

2. Polypeptide tel qu'obtenu :

i. par immunoprécipitation d'une ou plusieurs fraction(s) polypeptidique(s) de lysats de cellules exprimant des récepteurs KAR capables de transduire un signal activateur à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR, tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,

ii. chaque fraction polypeptidique pouvant optionnellement être plus avant épuisée par élimination des fractions immunoprécipitées à l'aide d'anticorps anti-CD3 et/ou anti-FcεRIγ, et/ou être à nouveau précipitée à l'aide



d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,

iii. par résolution des polypeptides de ladite (desdites) fraction(s) polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire, et récupération des polypeptides correspondant à un poids moléculaire de  $12 \pm 2$  kDa environ, ou bien

par résolution des polypeptides de ladite (desdites) fractions polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire après avoir soumis ladite (lesdites) fraction(s) polypeptidique(s) à un test kinase, et récupération des polypeptides phosphorylés correspondant à un poids moléculaire de 12, 14 et/ou  $16 \pm 2$  kDa environ,

ou fragment, ou homologue, d'un tel polypeptide, lesdits homologues ou fragments étant capables de transduire un signal provenant d'un KAR.

3. Polypeptide selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que lesdites cellules sont des cellules NK et/ou des cellules T et/ou des cellules myéloïdes et/ou des cellules B et/ou des mastocytes.

4. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est phosphorylé au niveau d'au moins un résidu tyrosine.

5. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il se présente sous la forme de dimères.

6. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il se lie à une molécule à domaine SH2 ou PTB.



7. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que sa séquence en acides aminés est essentiellement constituée par la SEQ ID N°2, n°3, n°4, ou n°5, n°11, n°12, n°13, n°14, n°15, n°17, ou n°28.

8. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est modifié par glycosylation, phosphorylation, sulfonation, biotinylation, acylation, estérification, par addition, substitution ou suppression d'entités de forme moléculaire proche de celle des groupes phosphate telles que le phosphonate, par addition de réactifs de marquage tels que la luciférase, la GFP (*Green Fluorescence Protein*) ou ses analogues, par addition de cibles de purification telles qu'un ligand d'affinité, par addition d'entités modifiant sa solubilité.

9. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est capable de traverser une membrane cellulaire.

10. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est modifié de telle sorte à inhiber sa capacité à transduire un signal.

11. Polypeptide selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il est modifié de telle sorte à être non hydrolysable dans des conditions biologiques, notamment par addition de groupes phosphonates.

12. Polypeptide selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il est modifié par substitution d'un résidu tyrosine par un résidu phénylalanine.



13. Anticorps ou fragment d'un tel anticorps, en particulier fragment Fc, Fv, Fab, F(ab)'<sub>2</sub>, CDR tel qu'obtenu par immunogénèse à partir d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, ou à partir d'un fragment d'un tel polypeptide.

14. Anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il est capable de reconnaître la SEQ ID n°2, SEQ ID n°3, SEQ ID n°4, SEQ ID n°5, SEQ ID n°11, SEQ ID n°12, SEQ ID n°13, SEQ ID n°14, SEQ ID n°15, SEQ ID n°17 et/ou SEQ ID n°28.

15. Acide nucléique ou variant d'un tel acide nucléique, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence correspondant à la lecture en cadre ouvert, selon le code génétique universel, de la séquence en acides aminés d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes.

16. Acide nucléique selon la revendication 15, ou variant d'un tel acide nucléique, caractérisé en ce que ledit acide nucléique présente une séquence essentiellement constituée par la SEQ ID n°1, n°6, n°7, n°8, n°9, n°10, n°16, n°27, n°31, ou n°18.

17. Procédé d'obtention d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes :

i. d'immunoprécipitation d'une ou plusieurs fraction(s) polypeptidique(s) de lysats de cellules KAR<sup>+</sup> à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR, tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,

FEUILLE MODIFIEE





ii. chaque fraction polypeptidique pouvant optionnellement être plus avant épuisée par élimination des fractions immunoprécipitées à l'aide d'anticorps anti-CD3 et/ou anti-FcεRIγ, et/ou être à nouveau précipitée à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,

iii. de séparation les polypeptides de ladite (desdites) fraction(s) polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire et récupérer les polypeptides correspondant à un poids moléculaire de  $12 \pm 2$  kDa environ, ou bien

de séparation des polypeptides de ladite (desdites) fraction(s) polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire après avoir soumis ladite (lesdites) fraction(s) polypeptidique(s) à un test kinase, et récupérer les polypeptides phosphorylés correspondant à un poids moléculaire de 12, 14 et/ou  $16 \pm 2$  kDa environ.

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que lesdites cellules KAR<sup>+</sup> sont des cellules NK et/ou des cellules T et/ou des cellules myéloïdes et/ou des cellules B et/ou des mastocytes.

19. Méthode pour l'obtention de la séquence d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'on opère par criblage parmi des séquences candidates pour ne sélectionner que celle(s) qui :

- présente(nt) au moins un acide aminé tyrosine phosphorylable,
- présente(nt) une masse moléculaire comprise entre 5 et 25 kDa environ,
- comporte(nt) une région extracytoplasmique, une région transmembranaire, et une région intracytoplasmique,
- comporte(nt) au moins un acide aminé cystéine dans sa région extracytoplasmique,

DEUTSCHE PATENT-ANWALTSGESellschaft



- comporte(nt) au moins un acide aminé chargé (R, K, D, E) dans sa région transmembranaire, et

- comporte(nt) au moins un motif ITAM YxxL/Ix<sub>6-8</sub>YxxL/I dans sa région intracytoplasmique, et que l'on s'assure que le(s) polypeptide(s) correspondant à la (les) séquence(s) sélectionnée(s) est (sont) capable(s) de s'associer à un récepteur KAR tout en ne s'associant pas au récepteur contrepartie inhibitrice de ce KAR.

20. Méthode pour déterminer si un polypeptide candidat correspond à un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- produire un anticorps mono- ou polyclonal dirigé contre ce polypeptide candidat, et en particulier contre une région extracytoplasmique de ce polypeptide candidat et/ou une région qui comprend au moins un motif ITAM,

- mettre en contact cet anticorps avec un lysat de cellules, possédant, sous une forme fonctionnelle, le récepteur activateur ou non inhibiteur pour lequel le polypeptide candidat est supposé constituer le KARAP dans des conditions douces permettant des réactions de liaison de type antigène-anticorps,

- identifier le polypeptide candidat comme étant un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 lorsque dans les produits de réaction éventuellement formés se trouvent un produit de masse moléculaire apparente proche de celle dudit récepteur activateur ou non inhibiteur, et un produit de masse moléculaire apparente proche de celle du polypeptide candidat.

21. Composition pharmaceutique comprenant, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable, une quantité efficace de polypeptides selon l'une quelconque des revendications précédentes, ou de fragments de tels polypeptides, ou une quantité efficace d'anticorps selon la revendication 13 ou



14, ou de fragments de tels anticorps, ou une quantité efficace d'acides nucléiques selon la revendication 15 ou 16, ou de variants de tels acides nucléiques.

22. Méthode de diagnostic *in vitro* d'un fonctionnement anormal ou non désiré d'une cellule, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes de:

- mise en contact d'au moins une cellule, ou un extrait de cellule, avec un anticorps selon la revendication 13 ou 14 ou un fragment d'un tel anticorps, ou avec un acide nucléique selon la revendication 15 ou 16 ou un variant d'un tel acide nucléique, et de

- révélation du produit de réaction éventuellement formé.

23. Méthode de diagnostic *in vitro* selon la revendication 22, caractérisée en ce que ledit fonctionnement anormal ou non désiré se traduit par une maladie immunoproliférative, une maladie d'immunodéficience telle qu'une maladie à VIH, un cancer tel que la maladie lymphoproliférative des lymphocytes granulaires, une maladie auto-immune telle que la polyarthrite rhumatoïde, une maladie infectieuse telle que le paludisme, une réponse allergique, un rejet de greffe.

24. Méthode d'identification de molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes de :

- i. mise en contact des molécules candidates avec des polypeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 (ou avec des fragments de tels polypeptides), et de

- ii. sélection de celles des molécules candidates pour lesquelles une liaison auxdits polypeptides (ou auxdits fragments de polypeptides) est observée.

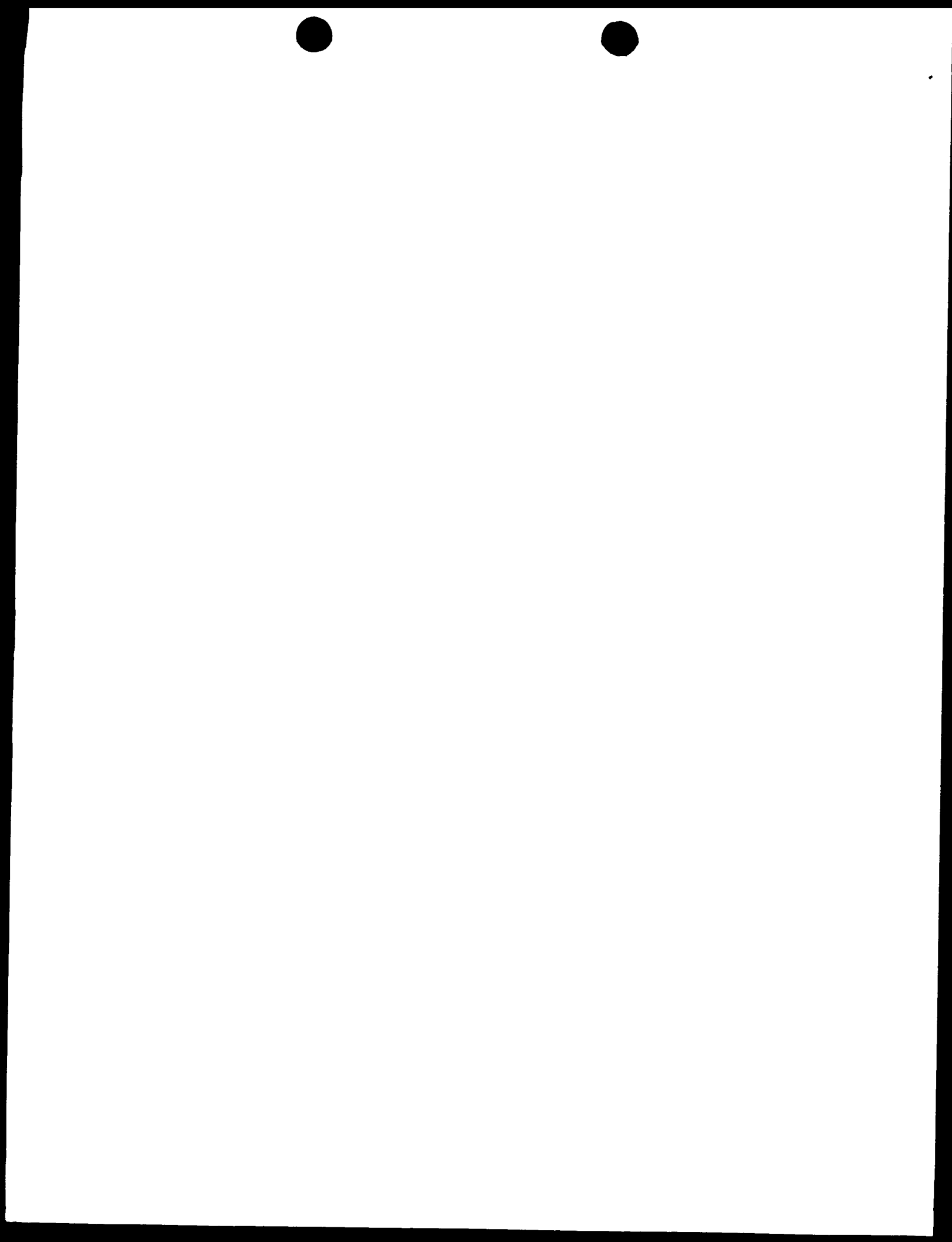


25. Méthode d'identification de molécules capables de moduler une activité cellulaire résultant de l'activation d'un KAR, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes de :

i. mise en contact des molécules candidates avec des molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR telles qu'obtenues par la méthode selon la revendication 24 et avec des polypeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 (ou avec des fragments de tels polypeptides), et de

ii. sélection de celles des molécules candidates qui exercent un effet sur la liaison entre lesdits polypeptides (ou lesdits fragments de polypeptides) et lesdites molécules adaptatrices ou effectrices, telle qu'observée en l'absence desdites molécules candidates.

FIGURE MODIFIEE





**Translation**

PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference CP/FP/VB 59269-814	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR98/00883	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 30 April 1998 (30.04.1998)	Priority date ( <i>day/month/year</i> ) 30 April 1997 (30.04.1997)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12		
Applicant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 8 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☐ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☐ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 11 November 1998 (11.11.1998)	Date of completion of this report 25 August 1999 (25.08.1999)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer  Telephone No. 49-89-2399-0



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR98/00883

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*)

☐ the international application as originally filed.

☒ the description. pages 1-49, 50\*, as originally filed.

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand.

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

☐ the claims. Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed.

Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19.

Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand.

Nos. 1-25, filed with the letter of 21 June 1999 (21.06.1999)

Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

☒ the drawings. sheets/fig 1/26-26/26, as originally filed.

sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand.

sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

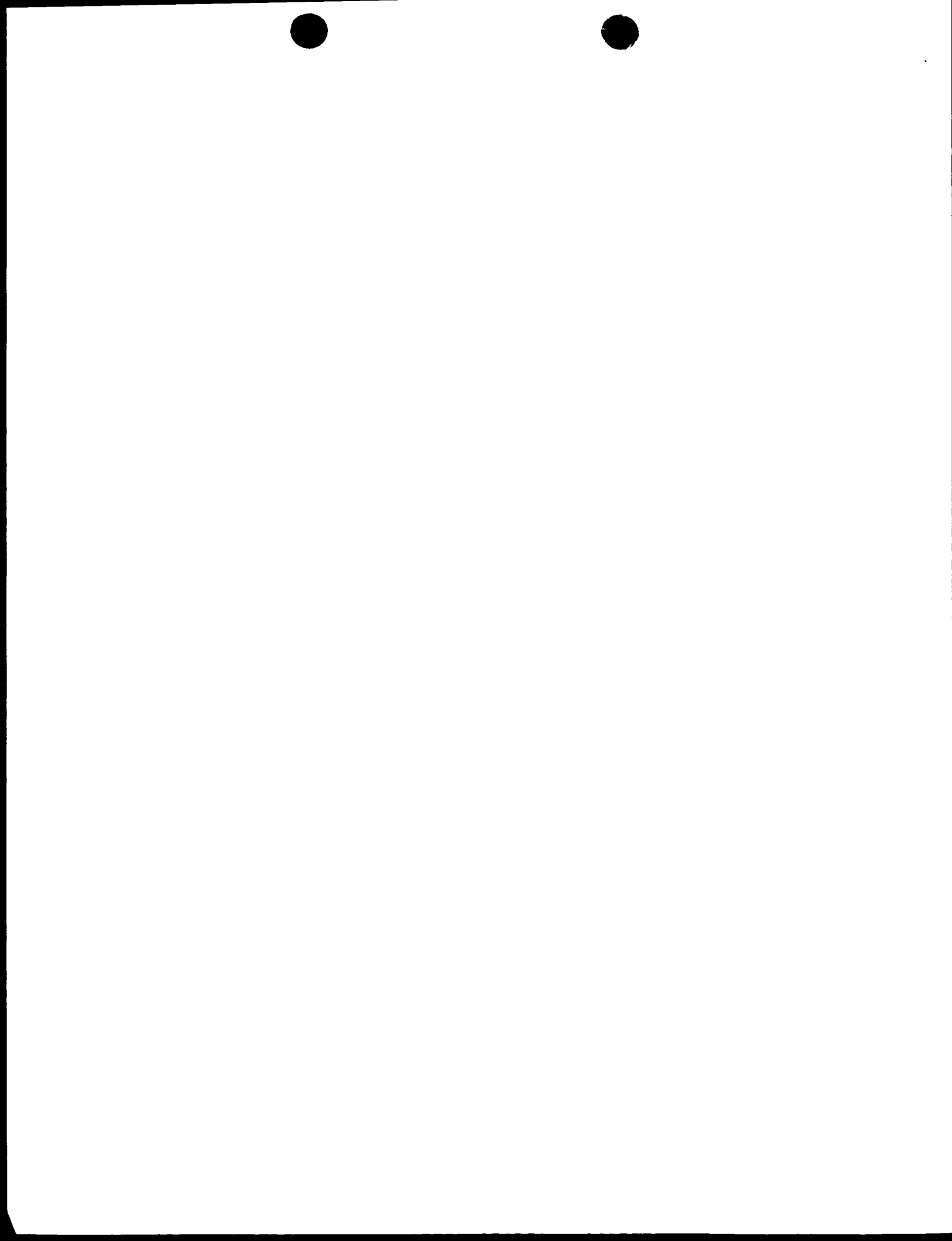
☐ the description. pages \_\_\_\_\_

☒ the claims. Nos. 26-31

☐ the drawings. sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-25	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

1. Examination of the present application has been carried out assuming that the claimed priority is valid. Should this prove not to be the case, an intermediate document might become pertinent in the assessment of the patentability of the subject of the present application.
2. Reference is made to the following document:  
  
D1: The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, no.14, pg. 8989-8996, 1997
3. Document D1 states that, in the NK and T cells, the KARs are part of a multimer complex containing KARAPs which appear to be needed for their activating function (page 8995, column 1, first paragraph). D1 indicates that the KAR's inhibitory counterpart, the KIRs, are not involved in such multimer complexes in the NK and T cells (page 8995, column 1, paragraph 2), which implies that the KARAPs, associated with the KARs in the NK and T cells, do not associate with the KIRs. D1 describes the functional reconstitution of the KARs in non-lymphoid cells, RTIIB cells, and shows that the KARs



reconstituted in this way are not functional, although they are in the NK and T cells (page 8989, column 2, third paragraph to page 8990, column 1, first paragraph.)

The subject of claims 1 and 2 is a KARAP polypeptide, or homologue with the same function. Such a homologue, which is capable of associating with a KAR and of not associating with the inhibitory counterpart of this KAR, is described in D1. Although D1 does not describe the isolation of the KARAPS, this authority is of the opinion that their isolation could be conducted by a person skilled in the art, taking into account the association disclosed in D1 between known KARs and KARAPS. As a result, claims 1-18 are not inventive (PCT Article 33(3)).

4. Obtaining an antibody which recognises a polypeptide known from the prior art or a nucleic acid coding for the amino acid sequence of such a polypeptide does not involve an inventive step. In addition, a method or a process concerning a subject which is part of the prior art, comprising steps known to a person skilled in the art, does not involve an inventive step. The same applies for a composition concerning a subject which is part of the prior art and comprising elements known to a person skilled in the art. As a result, claims 13-25 are not inventive (PCT Article 33(3)).

5. This application also lacks unity of invention *a posteriori* under the terms of PCT Article 13.1 and 13.3 for the following reasons:

The common concept linking the different independent





claims is one isolated polypeptide which allows a signal from a KAR to be transduced. This common concept does not fulfil the requirements of PCT Article 33(3) as its subject does involve an inventive step (see above). As a result, this common concept no longer exists. The present application includes, therefore 11 different inventions which are not related by a common inventive concept.

Each of the inventions partially refers to claims 1-25 and corresponds to a different polypeptide which enables the transduction of a signal from a KAR, its amino acid sequence comprising the SEQ ID No.2 (invention 1), 3 (invention 2), 4 (invention 3), 5 (invention 4), 11 (invention 5), 12 (invention 6), 13 (invention 7), 14 (invention 8), 15 (invention 9), 17 (invention 10), or 28 (invention 11).

This objection pertaining to unity of invention will not be followed up in this examination phase, but will be applied, should this application enter into the European regional phase.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR98/00883

## VI. Certain documents cited

### 1. Certain published documents (Rule 70.10)

Application No.  
Patent No.

Publication date  
(day month year)

Filing date  
(day month year)

Priority date (valid claim)  
(day month year)

See Separate Box

### 2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure

Date of non-written disclosure  
(day month year)

Date of written disclosure  
referring to non-written disclosure  
(day month year)



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 98/00883

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI

Certain documents published (PCT Rule 70.10)

1. The Journal of Immunology  
Vol.158, No.11, pg 5083-5086, 1997



## VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. This application describes three phosphorylated polypeptides capable of associating with KARs, having an apparent molecular weight of 12, 14, or 16 kDa, and a human cDNA coding (SEQ ID No.31) for a polypeptide which restores deficient KAR activation. This application does not provide any evidence as to whether the three phosphopolypeptides represent the same polypeptide with different degrees of phosphorylation and whether the human cDNA product (SEQ ID No.31) corresponds to at least one of these phosphopolypeptides.

It seems that the applicant, assuming that the three phospho-KARAPs and the isolated human cDNA product correspond to one and the same polypeptide, is claiming a polypeptide which combines certain characteristics of each of these polypeptides.

As a result, the subjects of Claims 1, 2, 7, 14, 16, 17, 19, 20 are not sufficiently supported by evidence for the following reasons:

- A. As the fact that the deficient KAR activity is restored has only been demonstrated in the case of the human cDNA product, nothing in the description indicates that the three phospho-KARAPs may also be able to restore a deficient KAR activation (Claim 1). In addition, there is also no evidence that the method for isolating the three phosphopeptides may be used to obtain the human cDNA product (Claims





## VII. Certain defects in the international application

2 and 17).

B. This application gives no evidence that the three phospho-KARAPs comprise:

- 1) An ITAM motif (Claims 1, 19 and 20)
- 2) Extracytoplasmic, transmembrane and intracytoplasmic regions (Claims 1 and 19)
- 3) An extracytoplasmic cysteine amino acid (claims 1 and 19)
- 4) A charged transmembrane amino acid (claims 1 and 19)

C. As the present application refers to a "similar group of KARAPs", there are doubts as to whether this refers to the same phospho-KARAPs as those previously mentioned as well as regarding the incapacity of the latter to associate with a KIR (page 34, line 15).

D. The three phospho-KARAPs of 12, 14, and 16 kDa and the polypeptide restoring deficient KAR activity are all products of human origin. The present application neither describes the presence of such phospho-KARAPs in mice, nor indicates that murine polypeptides (particularly those consisting of SEQ ID No.2, 3, 4, 5, 11, 12, 13, 14, 15, 17 or 28) restore deficient KAR activity (claims 7, 14, and 16).



## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The subject of Claims 1, 6, and 9-11 (a polypeptide) for which protection has been requested has not been clearly defined, due to the fact that this has not been defined by its technical features. In fact, these claims have been formulated in such a way that their subject is only defined in terms of the result to be obtained ("it enables...", "is capable of...", "binds to...", "inhibiting...", "to be non-hydrolyzable..."). Such definitions are only permissible under the conditions stipulated in the PCT Guidelines, C-III, 4.7. The formulations used here are not, however, permissible as it is possible to define the subject claimed in more concrete terms due to the fact that a polypeptide can be clearly defined by its protein sequence, in particular.
2. Claim 2 defines a polypeptide as the product of a method. This method, which is also claimed per se (claim 17) is vague and lacks clarity. Because of this, it is doubtful whether a person skilled in the art could reproduce it.
3. The subject of claims 3 and 18 is not based on the description. In fact, the latter only mentions the presence of KAR in NK and T cells. At no point is any mention made of myeloid cells, B cells or mastocytes (PCT Article 6).
4. The present application does not describe the binding of any polypeptide with a PTB domain molecule. Claim 6 is not based on the description. (PCT Article 6).



## VIII. Certain observations on the international application

5. The present application does not describe any polypeptide modified as per any of Claims 8 and 10-12. These claims are therefore not based on the description. (PCT Article 6).
6. The present application does not indicate in any way that one of the polypeptides that it describes is capable of passing through a cell membrane. Claim 9 is not therefore based on the description. (PCT Article 6).
7. Claim 19 describes a method for obtaining the sequence for a polypeptide having in particular, a molecular weight of between 5 and 25 kDa. However, this application only describes polypeptides with a molecular weight of 12, 14, or 16 kDa. As a result the claim for polypeptides having molecular weights different from the latter, is not based on the description (PCT Article 6).



## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

<b>Date d'expédition</b> (jour/mois/année) 09 décembre 1998 (09.12.98)	<b>Demande internationale no</b> PCT/FR98/00883	<b>Référence du dossier du déposant ou du mandataire</b> 59269-814
<b>Date du dépôt international</b> (jour/mois/année) 30 avril 1998 (30.04.98)	<b>Date de priorité</b> (jour/mois/année) 30 avril 1997 (30.04.97)	
<b>Déposant</b> VIVIER, Eric etc		

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

11 novembre 1998 (11.11.98)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Marianna Roux

no de téléphone: (41-22) 338.83.38





# PCT

## REQUETE

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Reserve à l'office récepteur

Demande internationale n°

Date du dépôt international

Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"

Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif)  
(12 caractères au maximum) 59269 - 814

**Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION** Nouveaux polypeptides associés à des récepteurs activateurs et leurs applications biologiques

**Cadre n° II DEPOSANT**

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE  
MEDICALE (INSERM)  
101 rue de Tolbiac  
75654 PARIS CEDEX 13  
FRANCE

☐ Cette personne est aussi inventeur.

n° de téléphone

n° de télécopieur

n° de téléimprimeur

Nationalité (nom de l'Etat) :

FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) :

FRANCE

Cette personne est déposant pour :

☐ tous les Etats désignés

☒ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique

☐ les Etats-Unis d'Amérique seulement

☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

**Cadre n° III AUTRE(S) DEPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)**

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

VIVIER Eric  
20 Bis, Chemin du Boudard  
13260 CASSIS  
FRANCE

Cette personne est :

☐ déposant seulement

☒ déposant et inventeur

☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) :

FRANCE

Cette personne est déposant pour :

☐ tous les Etats désignés

☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique

☒ les Etats-Unis d'Amérique seulement

☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

☒ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.

**Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRESENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE**

La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est/à été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme:

☒ mandataire

☐ représentant commun

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

PEAUCELLE Chantal et ARMENGAUD Alain  
Cabinet ARMENGAUD AINE  
3 avenue Bugeaud  
75116 PARIS, FRANCE

n° de téléphone

01 45 53 05 50

n° de télécopieur

01 47 55 12 96

n° de téléimprimeur

☐ Cocher cette case lorsque aucun mandataire ou représentant commun n'est ni a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée



Suite du cadre n° III AUTRES DEPOSANTS OU (AUTRES) INVENTEURS

Si aucun des sous-cadres suivants ne sont utilisés, la présente feuille ne doit pas être incluse dans la requête.

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom, pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

MORETTA Alessandro  
Via Nizza  
18/8 16136 GENOVA  
Italie

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement  
☒ déposant et inventeur  
☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) : ITALIE

Domicile (nom de l'Etat) : ITALIE

Cette personne est déposant pour :

- ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☒ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom, pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

OLCESE Lucia  
Via Palestro 23/7A  
16122 GENOVA  
ITALIE

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement  
☒ déposant et inventeur  
☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) : ITALIE

Domicile (nom de l'Etat) : ITALIE

Cette personne est déposant pour :

- ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☒ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom, pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

VELY Frédéric  
Résidence du Vallat La Farandole  
13260 CASSIS  
FRANCE

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement  
☒ déposant et inventeur  
☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) : FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE

Cette personne est déposant pour :

- ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☒ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom, pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

TOMASELLO Elena  
38 allée des Pins  
13009 MARSEILLE  
FRANCE

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement  
☒ déposant et inventeur  
☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

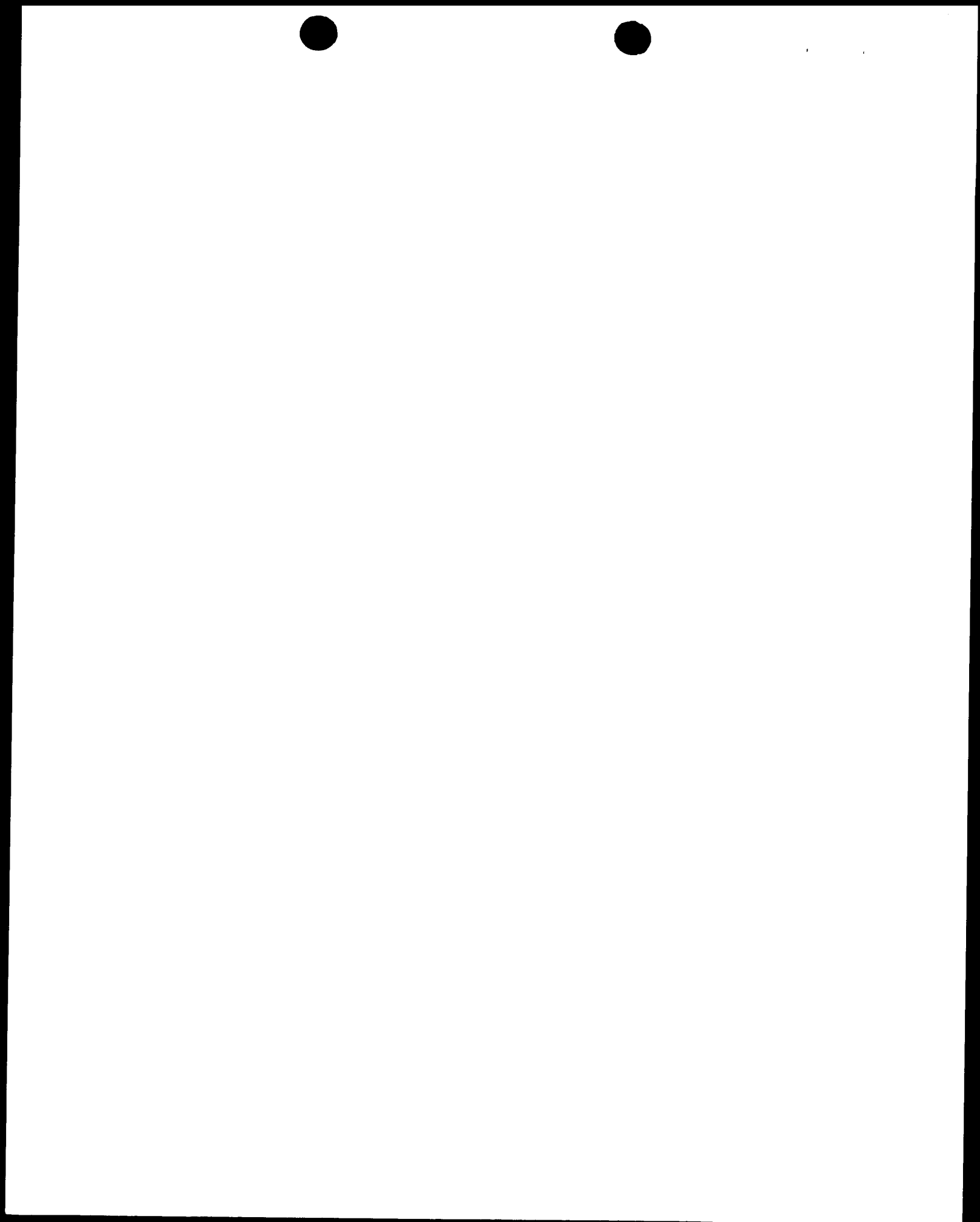
Nationalité (nom de l'Etat) : FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE

Cette personne est déposant pour :

- ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☒ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

☐ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexée.



## Cadre n° V DESIGNATION D'ETATS

Les désignations suivantes sont faites conformément à la règle 4.9 a) (cocher les cases appropriées: une au moins doit l'être)

## Brevet régional

- ☐ AP Brevet ARIPO : GH Ghana, GM Gambie, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Soudan, SZ Swaziland, UG Ouganda, ZW Zimbabwe et tout autre Etat qui est un Etat contractant du Protocole de Harare et du PCT
- ☐ EA Brevet eurasien : AM Arménie, AZ Azerbaïdjan, BY Bélarus, KG Kirghizistan, KZ Kazakhstan, MD République de Moldova, RU Fédération de Russie, TJ Tadjikistan, TM Turkménistan et tout autre Etat qui est un Etat contractant de la Convention sur le brevet eurasien et du PCT
- ☒ EP Brevet européen : AT Autriche, BE Belgique, CH et LI Suisse et Liechtenstein, DE Allemagne, DK Danemark, ES Espagne, FI Finlande, FR France, GB Royaume-Uni, GR Grèce, IE Irlande, IT Italie, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Pays-Bas, PT Portugal, SE Suède et tout autre Etat qui est un Etat contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT
- ☐ OA Brevet OAPI : BF Burkina Faso, BJ Bénin, CF République centrafricaine, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroun, GA Gabon, GN Guinée, ML Mali, MR Mauritanie, NE Niger, SN Sénégal, TD Tchad, TG Togo et tout autre Etat qui est un Etat membre de l'OAPI et un Etat contractant du PCT (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée)

## Brevet national (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée):

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> AL Albanie                                    | <input type="checkbox"/> LT Lituanie                              |
| <input type="checkbox"/> AM Arménie                                    | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg                            |
| <input type="checkbox"/> AT Autriche                                   | <input type="checkbox"/> LV Lettonie                              |
| <input type="checkbox"/> AU Australie                                  | <input type="checkbox"/> MD République de Moldova                 |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaïdjan                                | <input type="checkbox"/> MG Madagascar                            |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnie-Herzégovine                         | <input type="checkbox"/> MK Ex-République yougoslave de Macédoine |
| <input type="checkbox"/> BB Barbade                                    |   |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarie                                   | <input type="checkbox"/> MN Mongolie                              |
| <input type="checkbox"/> BR Brésil                                     | <input type="checkbox"/> MW Malawi                                |
| <input type="checkbox"/> BY Bélarus                                    | <input type="checkbox"/> MX Mexique                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada                          | <input type="checkbox"/> NO Norvège                               |
| <input type="checkbox"/> CH et LI Suisse et Liechtenstein              | <input type="checkbox"/> NZ Nouvelle-Zélande                      |
| <input type="checkbox"/> CN Chine                                      | <input type="checkbox"/> PL Pologne                               |
| <input type="checkbox"/> CU Cuba                                       | <input type="checkbox"/> PT Portugal                              |
| <input type="checkbox"/> CZ République tchèque                         | <input type="checkbox"/> RO Roumanie                              |
| <input type="checkbox"/> DE Allemagne                                  | <input type="checkbox"/> RU Fédération de Russie                  |
| <input type="checkbox"/> DK Danemark                                   | <input type="checkbox"/> SD Soudan                                |
| <input type="checkbox"/> EE Estonie                                    | <input type="checkbox"/> SE Suède                                 |
| <input type="checkbox"/> ES Espagne                                    | <input type="checkbox"/> SG Singapour                             |
| <input type="checkbox"/> FI Finlande                                   | <input type="checkbox"/> SI Slovénie                              |
| <input type="checkbox"/> GB Royaume-Uni                                | <input type="checkbox"/> SK Slovaquie                             |
| <input type="checkbox"/> GE Géorgie                                    | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone                          |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana                                      | <input type="checkbox"/> TJ Tadjikistan                           |
| <input type="checkbox"/> GM Gambie                                     | <input type="checkbox"/> TM Turkménistan                          |
| <input type="checkbox"/> GW Guinée-Bissau                              | <input type="checkbox"/> TR Turquie                               |
| <input type="checkbox"/> HU Hongrie                                    | <input type="checkbox"/> TT Trinité-et-Tobago                     |
| <input type="checkbox"/> ID Indonésie                                  | <input type="checkbox"/> UA Ukraine                               |
| <input type="checkbox"/> IL Israël                                     | <input type="checkbox"/> UG Ouganda                               |
| <input type="checkbox"/> IS Islande                                    | <input checked="" type="checkbox"/> US Etats-Unis d'Amérique      |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japon                           |   |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya                                      | <input type="checkbox"/> UZ Ouzbékistan                           |
| <input type="checkbox"/> KG Kirghizistan                               | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam                              |
| <input type="checkbox"/> KP République populaire démocratique de Corée | <input type="checkbox"/> YU Yougoslavie                           |
|  | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe                              |
| <input type="checkbox"/> KR République de Corée                        |   |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan                                 |   |
| <input type="checkbox"/> LC Sainte-Lucie                               |   |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka                                  |   |
| <input type="checkbox"/> LR Libéria                                    |   |
| <input type="checkbox"/> LS Lesotho                                    |   |

Cases réservées pour la désignation (aux fins d'un brevet national) d'Etats qui sont devenus parties au PCT après la publication de la présente feuille

Outre les désignations faites ci-dessus, le déposant fait aussi conformément à la règle 4.9 b) toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, sauf la désignation de \_\_\_\_\_

Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité doit être considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai. (Pour confirmer une désignation, il faut déposer une déclaration contenant la désignation en question et payer les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office receveur sans le délai de 15 mois.)



## Cadre n° VI REVENDEICATION DE PRIORITE

D'autres revendications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire ☐

La priorité de la ou des demandes antérieures suivantes est revendiquée

Pays (dans lequel ou pour lequel la demande a été déposée)	Date de dépôt (jour/mois/année)	Demande n°	Office de dépôt (seulement s'il s'agit d'une demande régionale ou internationale)
(1) FRANCE	30/04/1997	97 05411	
(2) FRANCE	28/01/1998	98 00927	
(3)			

Cocher la case ci-dessous si la copie certifiée conforme de la demande antérieure doit être délivrée par l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur (une taxe peut être exigée) :

☐ L'office récepteur est prié de préparer, et de transmettre au Bureau international, une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures indiquées ci-dessus au(x) point(s) : \_\_\_\_\_

## Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE

Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA)

(Si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé) : ISA / \_\_\_\_\_

Recherche antérieure Remplir si une recherche (internationale, de type international ou autre) a déjà été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette administration et si cette administration est maintenant priée de fonder la recherche internationale, dans la mesure du possible, sur les résultats de cette recherche antérieure. Pour permettre d'identifier cette recherche ou cette demande de recherche, donner les renseignements demandés ci-après pour la demande de brevet pertinente (ou sa traduction) ou pour la demande de recherche :

Pays (ou office régional) : FRANCE Date (jour/mois/année) : 30/04/1997 Numéro : FA 942993

## Cadre n° VIII BORDEREAU

La présente demande internationale comprend le nombre de feuilles suivant :

- |                   |    |          |
|-------------------|----|----------|
| 1. requête        | 04 | feuilles |
| 2. description    | 50 | feuilles |
| 3. revendications | 29 | feuilles |
| 4. abrégé         | 01 | feuilles |
| 5. dessins        | 26 | feuilles |

Total : 110 feuilles

Le ou les éléments cochés ci-après sont joints à la présente demande internationale :

- |  |  |
|--|--|
| 1. <input type="checkbox"/> pouvoir distinct<br>signé  | 5. <input type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes  |
| 2. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général   | 6. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant<br>des micro-organismes déposés      |
| 3. <input type="checkbox"/> explication de l'absence<br>d'une signature  | 7. <input type="checkbox"/> listage de séquence de nucléotides<br>ou d'acides aminés (disquette) |
| 4. <input checked="" type="checkbox"/> document(s) de priorité<br>(indiqué(s) dans le cadre<br>n° VI au(x) point(s)) : | 8. <input type="checkbox"/> autres éléments<br>(préciser) :                                      |

La figure n° \_\_\_\_\_ des dessins (le cas échéant) est proposée pour publication avec l'abrégé.

## Cadre n° IX SIGNATURE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE

A côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et, si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête, à quel titre l'intéressé signe.



PEAUCELLE Chantal

ARMENGAUD Alain

Réservé à l'office récepteur

1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale :

3. Date effective de réception, reconnue en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :

4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :

5. Administration chargée de la recherche internationale indiquée par le déposant

ISA /

6. ☐ Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche

2. Dessins :

☐ reçus :☐ non reçus :

Réserve au Bureau international

Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international





# PCT

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et regles 43 et 44 du PCT)

Reference du dossier du déposant ou du mandataire 59269-814	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 98/00883	Date du dépôt international (jour, mois, année) 30/04/1998	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour, mois, année) 30/04/1997
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA .....et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

2. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

3. ☒ La demande internationale contient la divulgation d'un listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés et la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage de séquence

☐ déposée avec la demande internationale

☒ fourni par le déposant séparément de la demande internationale

☐ sans être accompagnée d'une déclaration selon laquelle il n'inclut pas d'éléments allant au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle qu'elle a été déposée.

☐ transcrite par l'administration

4. En ce qui concerne le titre: ☐ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☒ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

**POLYPEPTIDES ASSOCIES A DES RECEPTEURS ACTIVATEURS ET LEURS APPLICATIONS BIOLOGIQUES**

5. En ce qui concerne l'abrégé,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

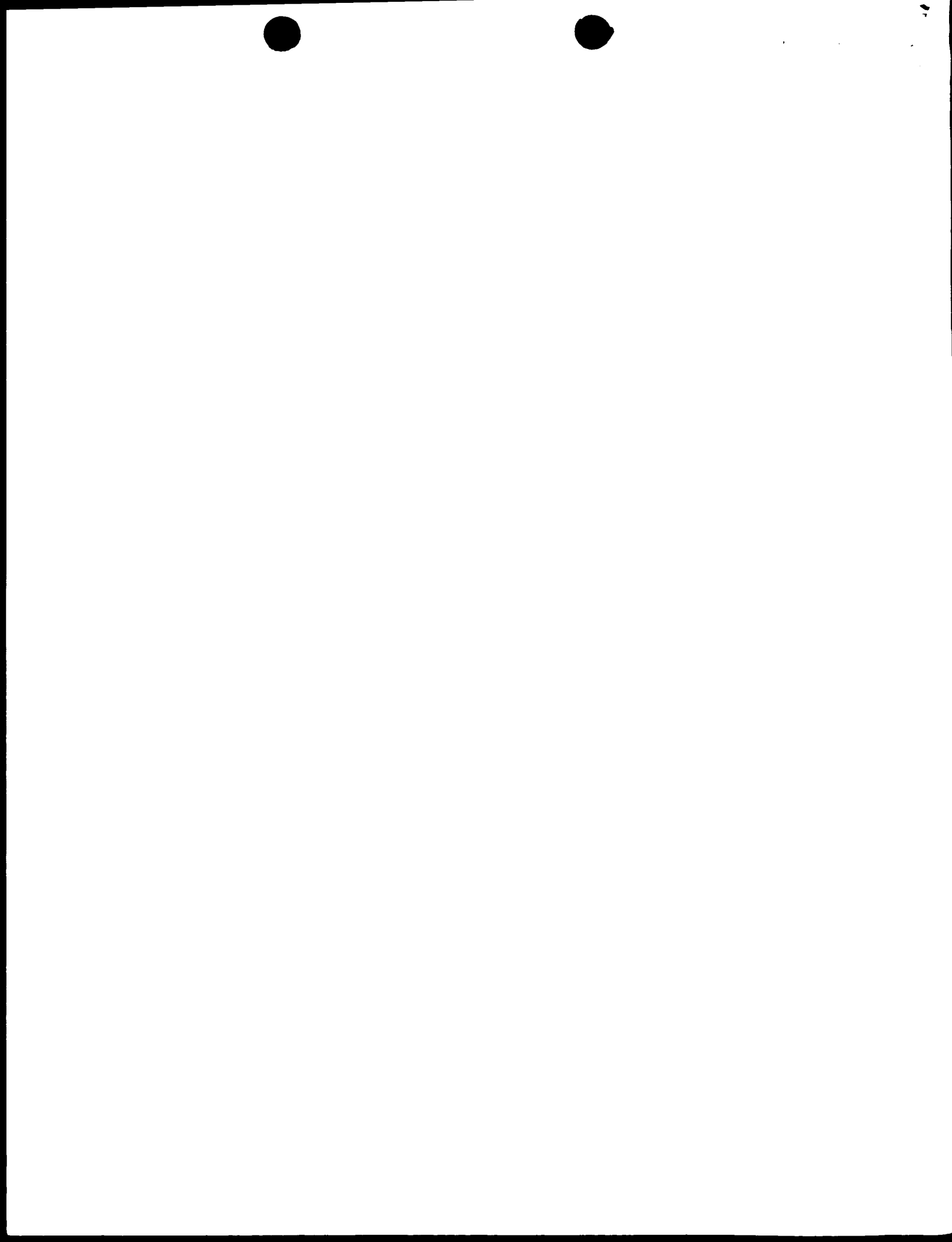
6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la suivante.

Figure n°            ☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☐ Aucune des figures n'est à publier.



A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE		CIB 6 C12N15/12 C07K14/705 C07K16/28 C07K1/36 A61K38/17	
CIB 6 G01N33/53 G01N33/68			
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB			
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE			
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)			
CIB 6 C07K			
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche			
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)			
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées	
X	M. BLÉRY ET AL.: "Reconstituted killer cell inhibitory receptors for major histocompatibility complex class I molecules control mast cell activation induced via immunoreceptor tyrosine-based activation motifs." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 14, 4 avril 1997, pages 8989-8996, XP002052877 BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS voir page 8994, colonne de droite, ligne 35 - page 8995, colonne de gauche, ligne 7 ---	2-4, 7, 15, 28-31	
A	WO 95 20604 A (SCHERING CORP. ET AL.) 3 août 1995 voir page 41, ligne 7 - page 44, ligne 13 voir revendications --- -/--	1-31	
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe	
* Catégories spéciales de documents cités:		"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "3" document qui fait partie de la même famille de brevets	
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée			
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
19 février 1999		26/02/1999	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale		Fonctionnaire autorisé	
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tél. +31-(0)340-2040, Tx 31-651-6001 Fax +31-(0)340-3016		Nooij, F	



C. (suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie	Identification des documents cites, avec le cas echeant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visees
P.X	<p>L. OLCESE ET AL.: "Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells." THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY. vol. 158, no. 11, 1 juin 1997, pages 5083-5086. XP002052878 BALTIMORE, MD, ETATS-UNIS voir le document en entier -----</p>	1-31



Formulaire PCT ISA 210 - annexe 1 (amilles de brevets) juillet 1992

